

**Avaliação analítica do teor de carotenoides em  
produtos hortícolas e pratos compostos  
representativos do consumo da população  
portuguesa**

**ANA CATARINA RUAS DE ALMEIDA**

(Licenciada em Engenharia Química e Biológica)

Trabalho Final de Mestrado para obtenção do grau de Mestre  
em Engenharia Química e Biológica

Orientadores:

Doutora Maria Celeste Serra

Doutora Maria da Graça S. Bento M. Leitão Dias

Júri:

Presidente: Doutora Rita Pacheco

Vogais: Mestre Mariana Santos

Doutora Maria Celeste Serra

fevereiro de 2017





Instituto Superior De Engenharia De Lisboa

Área Departamental De Engenharia Química

# **Avaliação analítica do teor de carotenoides em produtos hortícolas e pratos compostos representativos do consumo da população portuguesa**

**ANA CATARINA RUAS DE ALMEIDA**

(Licenciada em Engenharia Química e Biológica)

Trabalho Final de Mestrado para obtenção do grau de Mestre  
em Engenharia Química e Biológica

Orientadores:

Doutora Maria Celeste Serra

Doutora Maria da Graça S. Bento M. Leitão Dias

Júri:

Presidente: Doutora Rita Pacheco

Vogais: Mestre Mariana Santos

Doutora Maria Celeste Serra

fevereiro de 2017



O trabalho apresentado nesta dissertação foi realizado no âmbito do 2º Ciclo em Engenharia Química e Biológica – ramo de Bioprocessos do Instituto Superior de Engenharia de Lisboa, no Departamento de Alimentação e Nutrição do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, IP sob a orientação da Doutora Maria da Graça Dias e da Professora Doutora Maria Celeste Serra.



## Agradecimentos

Gostaria de agradecer ao Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, IP, por me ter proporcionado a oportunidade de realização do meu trabalho final de mestrado, que me fez crescer tanto a nível profissional como a nível pessoal, assim como ao projeto *TDSExposure* que me permitiu a realização do mesmo.

A todos os que constituem o Departamento de Alimentação e Nutrição (DAN) por toda a simpatia e amizade demonstradas durante a minha presença no departamento.

Às minhas orientadoras, Doutora Maria da Graça Dias e Doutora Maria Celeste Serra, por todo o apoio prestado, orientação na elaboração do trabalho, disponibilidade durante a execução do trabalho e por toda a amizade e paciência ao longo de todos estes meses.

Aos meus colegas de gabinete, Joana, Rita e Francisco, por todo o apoio prestado durante todos os meses de execução do trabalho, assim como por toda a amizade e paciência que tiveram comigo.

Por último, mas não menos importante, à minha família, em especial aos meus pais e irmã por todo o apoio nos momentos difíceis e por nunca me deixarem desistir do que acreditava.





## Resumo

No presente trabalho determinaram-se os teores dos carotenoides,  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno,  $\beta$ -criptoxantina, licopeno, luteína e zeaxantina presentes em amostras, de produtos hortícolas e pratos compostos representativos da alimentação da população portuguesa, recolhidas no âmbito do projeto TDSEXPOSURE (Total Diet Study Exposure – Estudo de dieta total para avaliação da exposição). Os resultados obtidos são um contributo para a avaliação da ingestão de carotenoides em Portugal.

As amostras foram sujeitas a um procedimento analítico validado que incluiu etapas de extração, assim como de saponificação, quando o teor de gordura e/ou a presença de ésteres de carotenoide o justificou.

A determinação dos analitos foi realizada através do método de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) de fase reversa com detetor DAD-UV/Vis e, a sua quantificação foi feita através de calibração externa e recorrendo também a um padrão interno.

O desempenho do método analítico foi avaliado com dois tipos de materiais de referência, o material de referência certificado (NIST 2383) e o material de referência interno preparado no laboratório. Os resultados obtidos para *z-score* permitiram concluir que os valores medidos são exatos.

O processo de homogeneização das amostras foi também avaliado estudando a homogeneidade da matriz alimentar tomate com pele e grainhas. A análise estatística dos resultados permitiu confirmar a homogeneidade das amostras.

Os carotenoides que se encontraram na maioria das amostras foram o  $\beta$ -caroteno (0,018-14 mg/100 g) e a luteína (0,0014-8,2 mg/100 g). Em 25% das amostras não foi detetado qualquer carotenoide.

O estudo sobre o efeito da sazonalidade no teor de carotenoides em produtos hortícolas recolhidos em duas estações do ano (outono e inverno) evidenciou alterações no teor de  $\beta$ -caroteno no feijão-verde, de luteína na couve-flor e de zeaxantina no pimento.

A determinação da atividade pró-vitamina A evidenciou um maior valor de equivalentes de retinol (RE) para a cenoura (2710 µg/100 g).

**Palavras-chave:** Carotenoides, HPLC, homogeneidade, sazonalidade, produtos hortícolas, pratos compostos, estudos de dieta total em Portugal

## Abstract

In the present work, the carotenoids,  $\alpha$ -carotene,  $\beta$ -carotene,  $\beta$ -cryptoxanthin, lycopene, lutein and zeaxanthin present in samples, in particular vegetables and composite dishes representative of the Portuguese population diet, were collected as part of the TDSEXPOSURE project (Total Diet Study Exposure). The results are a contribution to the evaluation of carotenoid intake in Portugal.

The samples were subjected to a validated analytical procedure that included extraction steps, as well as saponification steps, when the fat content and/or the presence of carotenoid esters justified it.

The determination of the analytes was carried out using the reverse phase high performance liquid chromatography (HPLC) method with DAD-UV / Vis detector and quantification was done through external calibration and also using an internal standard.

To evaluate the performance of the analytical method, two types of reference materials were analyzed, the certified reference material (NIST 2383) and the internal reference material prepared in the laboratory. The results obtained for z-score allowed to conclude that the measured values are exact.

The homogenization process of the samples was evaluated by studying the homogeneity of the tomato food matrix with skin and seeds. Statistical analysis confirmed that the homogenization process was adequate.

The carotenoids found in most of the analyzed samples were  $\beta$ -carotene (0.018-14 mg/100 g) and lutein (0.0014-8.2 mg/100 g). In 25% of the samples no carotenoid was detected.

The effect of seasonality on the carotenoid content in vegetables collected in two seasons of the year (autumn and winter) showed changes in  $\beta$ -carotene content in green beans, lutein in cauliflower and zeaxanthin in the pepper.

The activity evaluation as pro-vitamin A showed the highest value of retinol equivalent (RE) for carrot (2710  $\mu$ g/100 g).

**Keywords:** Carotenoids, HPLC, homogeneity, seasonality, vegetables, composite dishes, total study diet in Portugal

## Índice

Agradecimentos .....	I
Resumo .....	III
Abstract.....	V
Índice de Figuras .....	XI
Índice de Tabelas.....	XIII
1. Objetivos do trabalho .....	1
2. Enquadramento do tema .....	3
3. Introdução .....	5
3.1. Carotenoides .....	5
3.1.1. Características dos carotenoides .....	6
3.1.2. Fontes de carotenoides .....	9
3.1.3. Metabolismo e Biodisponibilidade .....	10
3.1.4. Efeitos na saúde.....	12
3.1.4.1. Atividade de pró-vitamina A.....	13
3.1.4.2. Efeito Antioxidante .....	15
3.1.4.3. Prevenção de doenças .....	16
3.2. Métodos analíticos de determinação do teor de carotenoides...	18
3.3. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) – princípios fundamentais .....	22
3.4. Validação de um método analítico .....	25
3.4.1. Avaliação Indireta.....	26
3.4.2. Avaliação Direta .....	28
3.4.2.1. Materiais de referência certificados .....	28
3.4.2.2. Ensaio de recuperação .....	29
3.4.2.3. Testes comparativos entre métodos.....	30

3.5. Amostragem .....	30
3.6. Avaliação da homogeneidade das amostras .....	31
4. Materiais e métodos .....	33
4.1. Reagentes e Padrões .....	34
4.2. Material .....	36
4.3. Equipamento.....	36
4.4. Preparação de soluções .....	38
4.4.1. Fase móvel e outras soluções de trabalho .....	38
4.4.2. Soluções de padrões internos.....	40
4.4.3. Soluções de padrões externos .....	40
4.5. Amostras.....	42
4.6. Plano de amostragem.....	46
4.7. Material de referência interno .....	47
4.8. Preparação das amostras.....	48
4.9. Análise cromatográfica das amostras.....	52
4.10. Avaliação da diferença mínima significativa entre resultados dos estudos de sazonalidade .....	55
4.11. Materiais de Referência.....	56
4.12. Equivalentes de Retinol (RE).....	58
5. Resultados e Discussão .....	59
5.1. Avaliação do desempenho do método.....	59
5.1.1. Material de Referência Certificado (NIST 2383).....	60
5.1.2. Material de Referência Interno .....	62
5.2. Estudo da homogeneidade de amostra .....	64
5.3. Análise do teor de carotenoides em amostras do projeto <i>TDSExposure</i> .....	66
5.3.1. Amostras não sazonais .....	66

5.3.1.1. Efeito do processo da saponificação no teor de carotenoides e análise das taxas de recuperação .....	89
5.3.2. Amostras sazonais .....	93
5.4. Equivalentes de Retinol .....	99
6. Conclusões.....	103
7. Proposta de trabalho futuro .....	107
8. Referências Bibliográficas .....	109
Anexos .....	123
Anexo 1 – Tabela do teste de Cochran .....	125
Anexo 2 – Comprimento de onda de absorção máxima dos carotenoides .....	127
Anexo 3 – Folha de Resultados referente às curvas de calibração de cada um dos carotenoides em estudo .....	129
Anexo 4 – Valores das incertezas para o material de referência interno .....	139
Anexo 5 - Incerteza dos estudos de validação .....	141
Anexo 6 – Incertezas para o material de referência certificado .....	143
Anexo 7 – Folha de cálculo utilizada na determinação da homogeneidade das amostras de tomate.....	145
Anexo 8 – Teste de Cochran ( <i>outliers</i> e homogeneidade).....	147
Anexo 9 - Folha de cálculo utilizada para determinação do teor de carotenoides .....	149
Anexo 10 - Poster exposto no Fórum de Engenharia Química e Biológica'16, ISEL (2016) .....	151
Anexo 11 – Poster exposto no XIII Encontro Química Alimentos (XIII EQA), Porto (2016) .....	153
Anexo 12 – Poster exposto na 9ª Reunião Anual PortFir, INSA (2016) .....	155





## Índice de Figuras

<b>Figura 3.1.</b> Estrutura das oito unidades isoprenóides para formação de $\beta$ -caroteno.....	6
<b>Figura 3.2.</b> Estrutura química dos carotenoides mais estudados no âmbito da saúde humana .....	8
<b>Figura 3.3.</b> Papel dos carotenoides na prevenção de doenças e as suas respetivas ações biológicas .....	13
<b>Figura 3.4.</b> Esquema com os principais componentes de um sistema de HPLC .....	23
<b>Figura 5.1.</b> Cromatograma do material certificado NIST 2383 com os respetivos carotenoides presentes – (1) luteína ( $t_r$ = 5,928 min); (2) zeaxantina ( $t_r$ = 6,271 min); (3) $\beta$ -apo-8'-carotenal ( $t_r$ = 7,306 min); (4) $\beta$ -criptoxantina ( $t_r$ = 10,342 min); (5) licopeno ( $t_r$ = 14,396 min); (6) – $\alpha$ -caroteno ( $t_r$ = 18,363 min); (7) $\beta$ -caroteno ( $t_r$ = 19,958 min).....	60
<b>Figura 5.2.</b> Teor de carotenoides nas amostras do grupo 5 – Pratos à base de carne (SS – Sem saponificação; S – Saponificação; SP – Saponificação prolongada) .....	71
<b>Figura 5.3.</b> Teor de carotenoides nas amostras do grupo 5 – Pratos à base de arroz (SS – Sem saponificação; S – Saponificação).....	74
<b>Figura 5.4.</b> Teor de carotenoides presentes em amostras do grupo 5 – Pratos de sopa (SS – Sem saponificação; S – Saponificação).....	77



## Índice de Tabelas

<b>Tabela 3.1.</b> Fontes alimentares dos principais carotenoides .....	10
<b>Tabela 3.2.</b> Fatores de conversão dos carotenoides em retinol .....	14
<b>Tabela 4.1.</b> Soluções padrão de trabalho .....	42
<b>Tabela 4.2.</b> Gradiente da fase móvel.....	52
<b>Tabela 4.3.</b> Condições cromatográficas .....	53
<b>Tabela 4.4.</b> Valores de incerteza padrão relativa combinada (s) de cada carotenoide .....	56
<b>Tabela 4.5.</b> Valores de referência para o material de referência certificado NIST 2383 .....	57
<b>Tabela 4.6.</b> Valores de referência para o material de referência interno .....	57
<b>Tabela 5.1.</b> Teores totais do $\alpha$ -caroteno, $\beta$ -caroteno e licopeno nas amostras de material de referência certificado (NIST 2383).....	61
<b>Tabela 5.2.</b> Teores do isómero <i>trans</i> da $\beta$ -criptoxantina, luteína e zeaxantina nas amostras de material de referência certificado (NIST 2383).....	61
<b>Tabela 5.3.</b> Valores de z-score para cada carotenoide presente na amostra de material de referência certificado (NIST 2383).....	61
<b>Tabela 5.4.</b> Teor de carotenoides no material de referência interno .....	62
<b>Tabela 5.5.</b> z-score para o material de referência interno .....	63
<b>Tabela 5.6.</b> Teores de $\beta$ -caroteno, licopeno e luteína nas amostras de tomate.....	64
<b>Tabela 5.7.</b> Valores observados na amostra de tomate e respetivos valores críticos.....	65
<b>Tabela 5.8.</b> Teor de carotenoides nas amostras do grupo 3 e respetivas recuperações .....	67
<b>Tabela 5.9.</b> Teor de carotenoides nas amostras do grupo 4 e respetivas recuperações .....	68
<b>Tabela 5.10.</b> Teor de carotenoides nas amostras do grupo 5 – Pratos à base de carne e respetivas recuperações .....	70
<b>Tabela 5.11.</b> Teor de carotenoides nas amostras do grupo 5 – Pratos à base de peixe.....	72

<b>Tabela 5.12.</b> Teor de carotenoides nas amostras do grupo 5 – Pratos à base de arroz e respetivas recuperações .....	73
<b>Tabela 5.13.</b> Teor de carotenoides nas amostras do grupo 5 – Pratos à base de ovos e de cereais e respetivas recuperações .....	74
<b>Tabela 5.14.</b> Teor de carotenoides nas amostras do grupo 5 – Pratos de sopa e respetivas recuperações .....	76
<b>Tabela 5.15.</b> Teor de carotenoides nas amostras do grupo 7 .....	78
<b>Tabela 5.16.</b> Teor de carotenoides nas amostras do grupo 11 .....	80
<b>Tabela 5.17.</b> Teor de carotenoides nas amostras do grupo 12 e respetivas recuperações .....	81
<b>Tabela 5.18.</b> Teor de carotenoides nas amostras do grupo 13 e respetivas recuperações .....	82
<b>Tabela 5.19.</b> Teor de carotenoides nas amostras do grupo 14 e respetivas recuperações .....	83
<b>Tabela 5.20.</b> Teor de carotenoides nas amostras do grupo 15 e respetivas recuperações .....	84
<b>Tabela 5.21.</b> Teor de carotenoides nas amostras do grupo 16 e respetivas recuperações .....	85
<b>Tabela 5.22.</b> Teor de carotenoides nas amostras do grupo 18 e respetivas recuperações .....	86
<b>Tabela 5.23.</b> Teor de carotenoides nas amostras do grupo 19 .....	87
<b>Tabela 5.24.</b> Teores de carotenoides em frutos e produtos hortícolas (mg/100 g) .....	88
<b>Tabela 5.25.</b> Efeito da sazonalidade no teor de carotenoides em produtos hortícolas .....	93
<b>Tabela 5.26.</b> Teor de carotenoides <i>versus</i> diferença mínima significativa (LSD) .....	95
<b>Tabela 5.27.</b> Teores de carotenoides em produtos hortícolas (mg/100 g) .....	96
<b>Tabela 5.28.</b> Equivalentes de retinol para amostras não sazonais.....	100

## Lista de Abreviaturas

**2D TLC** – *Two Dimensional Thin-Layer Chromatography* (Cromatografia de camada fina bidimensional - separação de amostras em duas direções ortogonais)

**ACN** – Acetonitrilo

**AMD** – *Age-Related Macular Degeneration* (Degeneração macular relacionada com a idade)

**APCI** – *Atmospheric Pressure Chemical Ionization* (Ionização química à pressão atmosférica)

**BHT** – Hidroxitolueno butilado

**BIPEA** – Bureau Interprofessionnel d'Etudes Analytiques

**CVD** – *Cardiovascular Disease* (Doença Cardiovascular)

**DCM** – Diclorometano

**DDR** – Dose Diária de Referência

**EFSA** – European Food Safety Authority (Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar)

**ESI** – *Electrospray Ionization* (Ionização por electrospray)

**EtOH** - Etanol

**FAPAS** – Food Analysis Performance Assessment Scheme

**GC-MS** – *Gas Chromatography-Mass Spectrometry* (Cromatografia gasosa com espetrometria de massa)

**HIV** - *Human Immunodeficiency Virus* (Vírus da Imunodeficiência Humana)

**HPLC** – *High-Performance Liquid Chromatography* (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)

**i** - Incerteza

**INSA** – Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge

**IU** – *International Unit* (Unidade Internacional)

**LAST** – *Lutein and Antioxidant Supplementation Trial* (Ensaio de suplementação de antioxidante e luteína)

**LC-MS** – *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry* (Cromatografia líquida com espetrometria de massa)

**LD** – Limite de deteção  
**LDL** - *Low Density Lipoprotein* (Lipoproteínas de baixa densidade)  
**LGC** – Laboratory of the Government Chemist  
**LQ** – Limite de Quantificação  
**LSD** – *Least Significant Difference* (Diferença mínima significativa)  
**MeOH** – Metanol  
**MTBE** – Éter metil terc-butílico  
**ND** – Não detetado  
**NFA** – National Futures Association  
**NIST** - *National Institute of Standards Technology*  
**PDA** – *Photodiode array detector* (Detetor de fotodíodo)  
**RAE** – *Retinol Activity Equivalents* (Equivalentes de atividade de retinol)  
**RE** – *Retinol Equivalents* (Equivalentes de retinol)  
**ROS** – *Reactive Oxygen Species* (Espécies Reativas de Oxigénio)  
**rpm** – rotações por minuto  
**S** – Saponificação  
**SFC** – *Supercritical Fluid Chromatography* (Cromatografia de fluido supercrítico)  
**SP** – Saponificação prolongada  
**SQ** – Saponificação a quente  
**SS** – Sem saponificação  
**TDSExposure** – *Total Diet Study Exposure* (Estudo da dieta total)  
**TEA** – Trietilamina  
**THF** – Tetra-hidrofurano  
**TLC** – *Thin-Layer Chromatography* (Cromatografia em camada fina)  
**UHPLC** – *Ultra-High Performance Liquid Chromatography*  
(Cromatografia líquida de ultra-eficiência)  
**USP** – Inform Search Platform  
**UV-Vis** – Ultra-Violeta Visível

## 1. Objetivos do trabalho

O presente trabalho envolveu a análise de alimentos com vista à determinação dos principais carotenoides,  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno,  $\beta$ -criptoxantina, licopeno, luteína e zeaxantina. As principais matrizes estudadas foram produtos hortícolas e pratos compostos representativos do consumo da população portuguesa.

Deste modo, os principais objetivos deste trabalho foram:

- Avaliação do processo pré-analítico de homogeneização das amostras, na vertente de determinação de carotenoides;
- Desenvolvimento do método de determinação de carotenoides para amostras com teores de gordura elevados;
- Determinação por HPLC do teor de carotenoides em amostras na maioria pertencentes aos grupos de pratos compostos, produtos hortícolas e produtos à base de cereais;
- Estimativa da atividade pró-vitamina A das amostras em estudo;
- Avaliação da variabilidade do teor em carotenoides em amostras recolhidas em diferentes estações do ano.





## 2. Enquadramento do tema

A importância dos carotenoides reside não só no facto deste tipo de compostos serem pigmentos que conferem coloração aos frutos e legumes, mas também pelos seus benefícios para a saúde humana, já que dietas ricas em carotenoides atuam na prevenção de vários tipos de doenças, como o cancro, doenças cardiovasculares e degeneração macular.

Estes compostos bioativos desempenham funções biológicas importantes atuando como antioxidantes e precursores de vitamina A, tendo-se assistido nos últimos anos a um aumento dos estudos da composição em carotenoides dos alimentos de forma a elaborar tabelas que sirvam de base a estudos, elaboração de dietas, etc.

Nesse sentido, o *Projeto TDSEXPOSURE (Total Diet Study Exposure* – Estudo da dieta total para avaliação da exposição), que decorreu a nível europeu e no âmbito do qual este trabalho foi realizado, e que teve como objetivo a harmonização de metodologias para avaliação da exposição com base em estudos de dieta total, e permitiu a utilização da metodologia desenvolvida com vista à avaliação da ingestão de carotenoides pela população portuguesa. Com vista a responder a este objetivo no âmbito deste trabalho foram analisadas diferentes amostras representativas da dieta dos Portugueses.



### 3. Introdução

#### 3.1. Carotenoides

O termo carotenoides deriva do nome caroteno (pigmento das cenouras) isolado pela primeira vez, em 1831, por Wachenroder a partir das raízes da cenoura. Após seis anos, Berzelius extraiu pigmentos amarelos das folhas de outono que designou por xantofilas. Em 1911, Tswett separou pela primeira vez carotenoides por cromatografia (Omenn, 1998).

Os carotenoides são um grupo de pigmentos naturais que estão presentes em frutas e produtos hortícolas e que são responsáveis pelas cores de amarelo a vermelho. Existem cerca de 750 carotenoides identificados na natureza, sendo que apenas 50 deles estão identificados na dieta humana, mas só cerca de 20 foram detetados no sangue e tecidos humanos (Arathi *et al.*, 2015; Khachik, 2006). Estes compostos são sintetizados por plantas, bactérias, algas e fungos; os animais não têm capacidade para os sintetizar. Desse modo, a principal fonte de carotenoides para os humanos reside na introdução de frutos e legumes na sua dieta.

Os carotenoides são compostos que após a sua biossíntese se acumulam, nas plantas, em plastídeos especializados, cromoplastos, cloroplastos ou leucoplastos (Dias *et al.*, 2009; Rao *et al.*, 2007; Saini *et al.*, 2015; Stahl *et al.*, 2003; Krinsky *et al.*, 2005).

Os carotenoides estão envolvidos em várias reações de reprodução de plantas, como por exemplo, na atração de polinizadores e dispersores de sementes. Também apresentam efeito protetor na reação fotossintética das plantas (Benítez-García *et al.*, 2014; Lu, 2008).

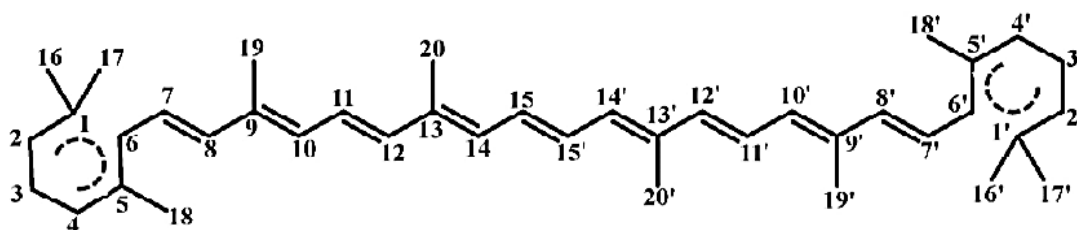
No que diz respeito à saúde humana, apresentam elevada importância devido à sua ação antioxidante assim como a sua atividade como pró-vitamina A. Além disto, através de estudos epidemiológicos, verificou-se que o consumo de alimentos contendo carotenoides, como

os frutos e produtos hortícolas estão associados a inúmeros benefícios para a saúde, como a redução do risco de doenças crónicas (cancro), de doenças cardiovasculares, de cataratas e da degeneração macular (Dias *et al.*, 2008; Riso *et al.*, 2004; Rodriguez-Amaya, 2015; Weisburger, 2002).

Os carotenoides mais estudados no que diz respeito à saúde humana e os que estão presentes em maior quantidade nos frutos e legumes são:  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno,  $\beta$ -criptoxantina, licopeno, luteína e zeaxantina (Rodriguez-Amaya, 2010).

### 3.1.1. Características dos carotenoides

Em termos de estrutura, os carotenoides são terpenóides  $C_{40}$  bio-sintetizados a partir da ligação de duas moléculas  $C_{20}$  de geranilgeranil-difosfato. Os carotenoides consistem em oito unidades isoprenóides ligadas entre si de maneira específica, de modo que a organização dos isoprenóides seja invertida no centro da molécula (Britton *et al.*, 2009; Esteban *et al.*, 2015; Namitha *et al.*, 2010; Saini *et al.*, 2015).



**Figura 3.1.** Estrutura das oito unidades isoprenóides para formação de  $\beta$ -caroteno (fonte: adaptado de Saini *et al.*, 2015)

A ocorrência de diversas estruturas de carotenoides está relacionada com o facto de estes compostos apresentarem diferenças nas suas características químicas, ou seja, por exemplo, a presença e o número de átomos de oxigénio presentes na molécula; a hidrogenação

da cadeia polieno de carbono; a ciclização das extremidades da molécula e o comprimento do cromóforo (parte da molécula de carotenoide responsável pela cor e pela ação fotoprotetiva) (Britton, 1995; Esteban *et al.*, 2015; Melendez-Martínez *et al.*, 2007).

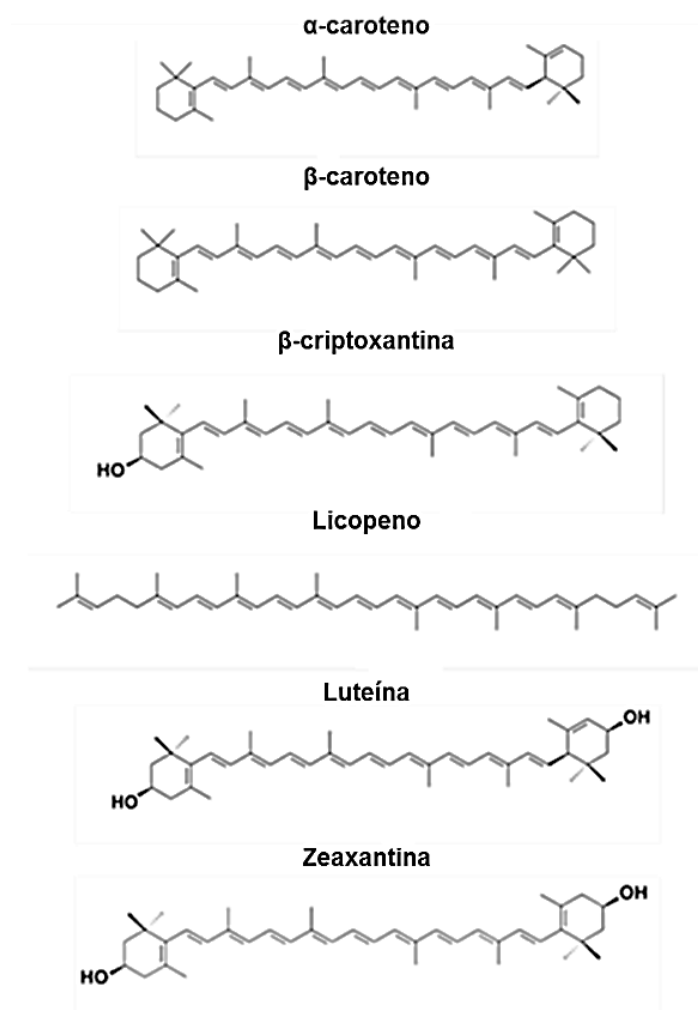
Desse modo, os carotenoides são classificados em dois grupos tendo em conta os grupos funcionais:

- **Xantofilas:** carotenoides, como por exemplo, luteína e zeaxantina, que apresentam como grupo funcional átomos de oxigénio;
- **Carotenos:** carotenoides que apenas apresentam a cadeia de hidrocarboneto sem a presença de qualquer grupo funcional, como é o caso do  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno e licopeno.

As xantofilas representam o grupo de carotenoides mais complexo, no que diz respeito ao número de compostos e às variações que podem ocorrer na sua estrutura. Desse modo, podem ser encontrados na sua forma livre (tal como os carotenos) ou na sua forma esterificada (mais estável) como mono ou poli-xantofilas. No que diz respeito à solubilidade, sabe-se que os carotenos são um grupo hidrofóbico, com pouca ou nenhuma solubilidade na água, enquanto as xantofilas apresentam uma solubilidade moderada na água. Sendo assim, os carotenoides estão restritos a zonas lipofílicas da célula, como a região interna das membranas celulares ou através da ligação a proteínas (Bernstein *et al.*, 2016; Britton, 1995; Murillo *et al.*, 2013; Saini *et al.*, 2015).

A presença de ligações duplas ou grupos cíclicos nas extremidades da estrutura dos carotenoides leva à formação de isómeros *cis/trans*. Na natureza, o isómero mais abundante é o isómero na forma *trans*, por ser mais estável do que os isómeros na forma *cis* (Gupta *et al.*, 2015; Rao, 2007; Saini *et al.*, 2015).

As estruturas químicas dos carotenoides mais estudados em termos de saúde humana são representadas na Figura 3.2.



**Figura 3.2.** Estrutura química dos carotenoides mais estudados no âmbito da saúde humana (fonte: adaptado de Fernández-García *et al.*, 2012)

Os carotenoides apresentam propriedades eletrónicas e espectroscópicas e, dependendo da configuração e comprimento do cromóforo das ligações duplas conjugadas, o espectro de UV-Vis (ultra-violeta visível) obtido varia consoante o tipo de carotenoide. O cromóforo é a parte do carotenoide responsável pela cor características dos carotenoides, assim como pela sua ação fotoprotetiva. No que diz respeito ao β-caroteno, o cromóforo é constituído por 11 ligações duplas

conjugadas o que permite que a absorção de luz no espectro eletromagnético seja realizada na zona do visível (400-500 nm) (Britton, 2008; Esteban *et al.*, 2015; Meléndez-Martínez *et al.*, 2007; Saini *et al.*, 2015).

Devido à presença de insaturações na sua estrutura os carotenoides são compostos suscetíveis à isomerização e oxidação, uma vez que são sensíveis à luz, temperatura, presença de oxigénio e contacto com superfícies ativas (como material de plástico). Desse modo, as características enumeradas devem ser tidas em conta na determinação analítica dos carotenoides (Ambrósio *et al.*, 2006; Dias *et al.*, 2008).

### 3.1.2. Fontes de carotenoides

Os carotenoides estão presentes em vários alimentos comuns, no entanto os frutos, os sumos e os vegetais são as principais fontes de carotenoides na alimentação. O  $\alpha$ -caroteno e o  $\beta$ -caroteno estão presentes em maior quantidade em produtos hortícolas e frutas. Os frutos de cor laranja fornecem  $\beta$ -criptoxantina. O licopeno está presente no tomate e seus derivados. Por fim, a zeaxantina e a luteína são componentes dos vegetais de cor verde escura, assim como da gema de ovo (Amorim-Carrilho *et al.*, 2014; Rao *et al.*, 2007).

As diversas fontes alimentares dos principais carotenoides são enumeradas na Tabela 3.1 (Amorim-Carrilho *et al.*, 2014; Britton *et al.*, 2009; Fernández-García *et al.*, 2012).

**Tabela 3.1.** Fontes alimentares dos principais carotenoides (fonte: adaptado de Amorim-Carrilho *et al.*, 2014; Fernández-García *et al.*, 2012; Britton *et al.*, 2009)

Tipo de Carotenoides	Fonte alimentar
<b><math>\alpha</math>-caroteno</b>	Abóbora; cenoura; feijão-verde; batata-doce; brócolos; espinafres
<b><math>\beta</math>-caroteno</b>	Espinafres; abóbora; cenoura; batata-doce; couve; nabo; alface; manga; melão; pimentão
<b>Licopeno</b>	Tomate; melancia; goiaba
<b>Luteína e Zeaxantina</b>	Espinafres; couves; milho; dióspiros; brócolos; ovos
<b><math>\beta</math>-criptoxantina</b>	Laranja; papaia; tangerina; milho; gema de ovo; ervilhas

Pelo facto de os carotenoides apresentarem uma natureza insaturada, estão sujeitos a modificações, principalmente através da oxidação. No entanto, a temperatura, a luz e o pH são outros fatores que podem levar a alterações as quais influenciam a cor dos alimentos, assim como o seu valor nutricional (Meléndez-Martínez *et al.*, 2004; Rao *et al.*, 2007).

Os carotenoides são reconhecidos como compostos que apresentam um papel benéfico para a saúde humana, no entanto não são considerados como nutrientes essenciais e, desse modo, não lhes é atribuído um valor de dose diária de referência (DDR) (Rao *et al.*, 2007).

### 3.1.3. Metabolismo e Biodisponibilidade

Os carotenoides são compostos bioativos que apresentam benefícios para a saúde humana. Para exercer os seus efeitos biológicos, os carotenoides têm de ser libertados da matriz alimentar e atingir o seu local de ação. Dessa forma, a bioacessibilidade e biodisponibilidade são parâmetros importantes na avaliação do papel destes compostos na saúde humana (Amorim-Carrilho *et al.*, 2014; Mandalari *et al.*, 2013; Rodríguez-Roque *et al.*, 2013).



A biodisponibilidade representa a porção do carotenoide que é absorvida pelo corpo e que se torna disponível para ser utilizada em funções fisiológicas ou para armazenamento no corpo humano. Por outro lado, a bioacessibilidade representa a fração de carotenoides ingerida que é libertada a partir da matriz alimentar durante a digestão, isto é, a fração disponível para absorção intestinal (Amorim-Carrilho *et al.*, 2014; Ekesa *et al.*, 2012; Rodriguez-Amaya, 2015; Saini *et al.*, 2015; Sy *et al.*, 2012).

A biodisponibilidade de carotenoides em alimentos é difícil de determinar, uma vez que, esta pode ser afetada por vários fatores, tanto dietéticos como fisiológicos. No que diz respeito, ao alimento, os fatores a ter em consideração são: a quantidade e o tipo de carotenoide; o tipo de matriz alimentar; o estado físico e a localização na célula do carotenoide; tamanho das partículas do alimento; método de processamento/preparação do alimento; interação entre carotenoides; e ingestão de outros compostos alimentares, como, por exemplo, gorduras. A biodisponibilidade também é afetada por fatores relacionados com o hospedeiro, como: o seu estado nutricional; uma ineficiente absorção de lípidos; existência de infeções, parasitas intestinais; e fatores genéticos (Castenmiller *et al.*, 1998; Erdman *et al.*, 1993; Furr *et al.*, 1997; Rodriguez-Amaya, 2010; van het Hof *et al.*, 2000; Yeum *et al.*, 2002; Yonekura *et al.*, 2007; Zaripheh *et al.*, 2002).

A determinação da biodisponibilidade de carotenoides em alimentos é mais precisa quando são utilizados estudos cuidadosamente controlados em seres humanos. No entanto, estes estudos além de apresentarem restrições éticas (utilização de humanos em estudos), também apresentam desvantagens significativas, como: trabalho intensivo, dispendioso (tanto em termos económicos como em termos de duração) e complexo, conduzindo a limitações quer nos ensaios a realizar quer nas conclusões. A utilização de modelos de animais para estudos de biodisponibilidade não é uma ideia em consideração, devido a questões éticas, financeiras (dispendioso) e às diferenças fisiológicas

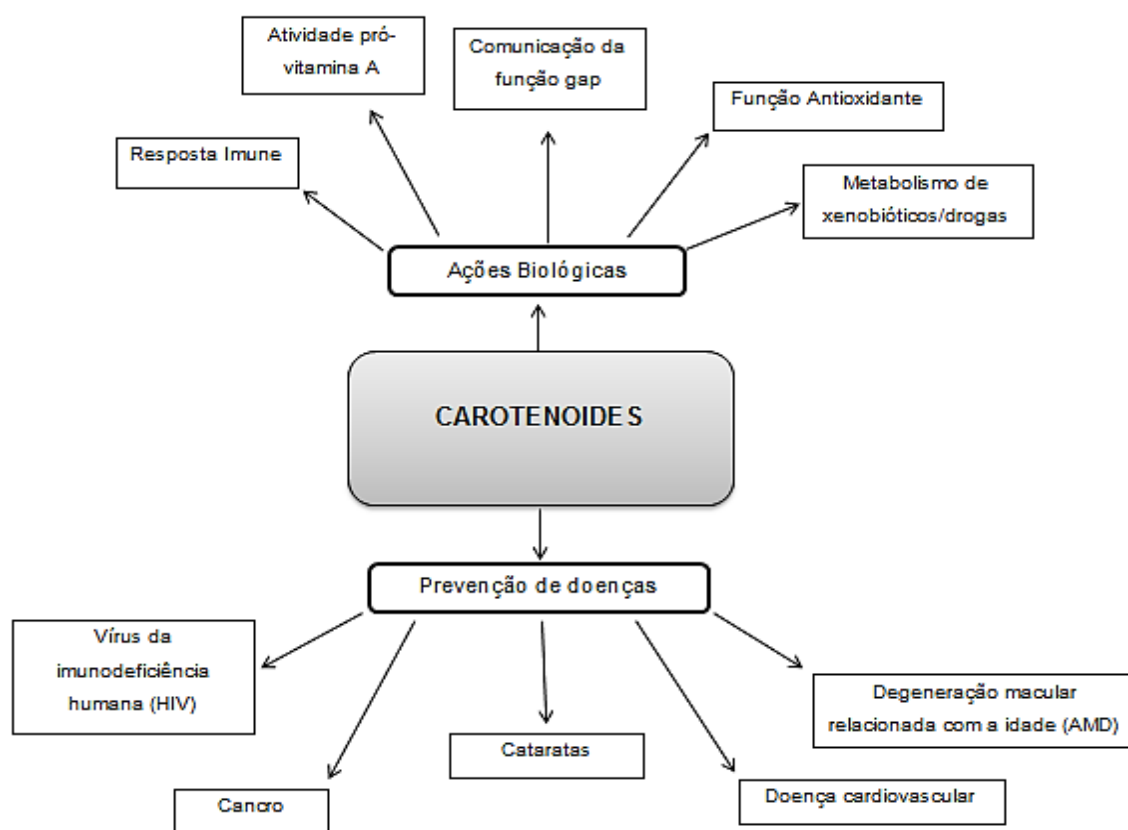
existentes entre os animais e os humanos. Dessa forma, têm sido desenvolvidos métodos *in vitro* que permitem o estudo indireto da biodisponibilidade de carotenoides em alimentos de uma forma simples, barata, rápida e reproduzível. Atualmente, o método mais utilizado para estudar a bioacessibilidade de constituintes dos alimentos foi desenvolvido por Garret *et al.* e, é um modelo estático de digestão acoplado com uma absorção celular Caco-2 (Amorim-Carrilho *et al.*, 2014; Failla *et al.*, 2004; Garret *et al.*, 1999; Rodriguez-Amaya, 2010; Rodriguez-Amaya, 2015; Roman *et al.*, 2012; Saini *et al.*, 2015).

A utilização destes métodos *in vitro* permite a realização de uma investigação mais detalhada dos fatores que estão relacionados com os alimentos numa elevada gama de produtos alimentares, assim como, permite a análise de um elevado número de amostras (alimentos) num curto espaço de tempo (Rodriguez-Amaya, 2015; Saini *et al.*, 2015).

#### **3.1.4. Efeitos na saúde**

Os carotenoides apresentam uma elevada diversidade de funções biológicas importantes, tanto para os organismos que os sintetizam como para os seres humanos e animais. Os efeitos biológicos dos carotenoides em animais são de três tipos: funções (essenciais para capacidade fisiológica); ações (considerado como resposta fisiológica, mas não é essencial) e associações (correlação entre os carotenoides e eventos fisiológicos) (Bendich *et al.*, 1989; Esteban *et al.*, 2015).

Dada a importância dos carotenoides na saúde humana, na Figura 3.3 é apresentado o papel dos carotenoides na prevenção das doenças crónicas, assim como as suas ações biológicas nos seres humanos.



**Figura 3.3.** Papel dos carotenoides na prevenção de doenças e as suas respetivas ações biológicas (fonte: adaptado de Rao *et al.*, 2007)

#### 3.1.4.1. Atividade de pró-vitamina A

Os animais e os seres humanos não apresentam capacidade de síntese de carotenoides, mas são capazes de metabolizar alguns tipos de carotenoides para que estes funcionem como precursores de vitamina A (retinol). A atividade de pró-vitamina A é a capacidade que os carotenoides têm de formar vitamina A (retinol) através de um processo de oxidação, com clivagem no centro da molécula catalisada pela enzima  $\beta$ -caroteno 15-15'-mono-oxigenase (EC 1.13.11.21). No entanto, dependendo da estrutura química, cada carotenoide apresenta diferentes percentagens de atividade de pró-vitamina conforme se apresenta na

Tabela 3.2 (Ambrósio *et al.*, 2006; Fernández-García *et al.*, 2012; Saini *et al.*, 2015).

Na natureza existem 750 tipos de carotenoides, no entanto, apenas 50 desses apresentam o requisito principal para a presença de atividade de pró-vitamina A, sendo os mais importantes o  $\beta$ -caroteno, o  $\alpha$ -caroteno e a  $\beta$ -criptoxantina. O principal requisito que estes compostos têm de apresentar é a existência de, pelo menos, um anel  $\beta$ -ionona não modificado que após a sua clivagem proporciona ao composto atividade de pró-vitamina A (Fernández-García *et al.*, 2012; Mínguez-Mosquera *et al.*, 1997; Saini *et al.*, 2015; Send *et al.*, 2007).

A contribuição dos carotenoides com atividade pró-vitamina A está dependente de hábitos alimentares e das fontes de alimentos que estejam disponíveis (Fernández-García *et al.*, 2012; Stahl *et al.*, 2005).

A atividade dos carotenoides como vitamina A (retinol) é determinada pela sua conversão em equivalentes de retinol (RE – *Retinol Equivalents*). Os fatores de conversão são apresentados na Tabela 3.2 (Campos *et al.*, 2005; Eitenmiller *et al.*, 2007; Fernández-García *et al.*, 2012; Saini *et al.*, 2015).

**Tabela 3.2.** Fatores de conversão dos carotenoides em retinol (fonte: adaptado de Saini *et al.*, 2015; Eitenmiller *et al.*, 2007; Fernández-García *et al.*, 2012; Campos *et al.*, 2005)

	Retinol ( $\mu\text{g}$ )	$\beta$ -caroteno ( $\mu\text{g}$ )	$\alpha$ -caroteno ( $\mu\text{g}$ )	$\beta$ -criptoxantina ( $\mu\text{g}$ )
RE	1	6	12	12
RAE	1	12	24	24
IU	0.3	0.6	—	—

A escolha destes fatores está relacionada com a eficiência de conversão de  $\beta$ -caroteno em retinol e a sua taxa de absorção. Nesse mesma altura, foi introduzido o conceito de equivalentes de atividade de retinol (RAE – *Retinol Activity Equivalents*), estando estes evidenciados

na Tabela 3.2. Outro fator de conversão, para a determinação do teor de vitamina A através da pró-vitamina A, é a Unidade Internacional (IU – *International Unit*) (Campos *et al.*, 2005; Fernández-García *et al.*, 2012; Saini *et al.*, 2015).

#### 3.1.4.2. Efeito Antioxidante

Os carotenoides apresentam um elevado potencial antioxidante, isto é, são capazes de desativar espécies reativas de oxigénio (ROS – *Reactive Oxygen Species*) e sequestrar radicais livres. Deste modo, é possível prevenir várias doenças crónicas, como doenças neuro-degenerativas, cancro, diabetes de tipo II, desordens musculares, doenças cardiovasculares, entre outras (Edge *et al.*, 1997; Esteban *et al.*, 2015; Fiedor *et al.*, 2014; Rios *et al.*, 2009; Stahl *et al.*, 2003; Wen *et al.*, 2013).

As ROS são produzidas durante o metabolismo aeróbico e processos patológicos, sendo prejudiciais para moléculas biológicas importantes, como lípidos, ADN e proteínas (Halliwell, 1996; Sies, 1986; Stahl *et al.*, 2005).

Os carotenoides atuam sobre o oxigénio singlete ( $^1\text{O}_2$ ) – um tipo de ROS – desativando-o através de transferência de energia, podendo esse processo ser físico ou químico. O processo físico envolve a transferência de energia de excitação do oxigénio singlete ( $^1\text{O}_2$ ) para o carotenoide ( $^1\text{CAR}$ ), resultando no oxigénio no estado fundamental  $\text{O}_2$  ( $^1\Delta_g$ ) e o carotenoide no estado de tripleto excitado ( $^3\text{CAR}^*$ ). Por outro lado, o processo químico resulta na destruição do cromóforo e na formação de produtos de oxidação que podem apresentar a possibilidade de reações de adição (Rios *et al.*, 2009; Stahl *et al.*, 1993; Stahl *et al.*, 1994; Stahl *et al.*, 2003; Stahl *et al.*, 2005; Stratton *et al.*, 1993).

A capacidade de desativação de ROS pelos carotenoides está relacionada com o número de ligações duplas conjugadas e a presença

de grupos substituintes (Baltuschum *et al.*, 1997; Hirayama *et al.*, 1994; Rios *et al.*, 2009; Schmidt, 2004; Stahl *et al.*, 2005).

### 3.1.4.3. Prevenção de doenças

Como referido anteriormente, os carotenoides têm elevada importância na prevenção de vários tipos de doenças. Desse modo, existem três doenças em que os efeitos benéficos dos carotenoides são mais conhecidos, sendo elas o cancro, as doenças cardiovasculares e a degeneração macular relacionada com a idade.

Em relação ao cancro sabe-se que é uma das doenças predominantes em todo o mundo atingindo milhões de pessoas. Em Portugal, no ano de 2015, existiam cerca de 50.000 mil casos de cancro diagnosticados, no entanto, o número de casos ao longo dos anos tende a aumentar rapidamente (Liga Portuguesa contra o cancro; Programa Nacional para as Doenças Oncológicas, 2016).

A maioria dos casos de cancro está relacionada com fatores ambientais e com estilo de vida de cada pessoa (tabagismo, hábitos alimentares inadequados, sedentarismo). Desse modo, estudos epidemiológicos demonstraram que o consumo de alimentos ricos em carotenoides (frutas e vegetais) diminui o risco de ocorrência de cancro (Blot *et al.*, 1993; Ministério da saúde, 1996; Omaye *et al.*, 1997; Pelissari *et al.*, 2008; Paula *et al.*, 2004; Stahl *et al.*, 2005).

Os alimentos contendo carotenoides apresentam um efeito protetor contra a carcinogénese, uma vez que, inibem a proliferação celular, a transformação e a formação de micronúcleos, assim como permitem a modulação da expressão de certos genes (Collins, 2001; Fraser *et al.*, 2004).

O carotenoide mais estudado em relação à sua ação sobre o cancro é o  $\beta$ -caroteno. Estudos demonstraram que a presença deste tipo de carotenoide afeta a expressão do ácido retinóico e permite o aumento da resposta imunológica. No entanto, a exposição ao tabaco ou a

amianto faz com que o  $\beta$ -caroteno livre ou convertido em vitamina A aumente a incidência do cancro assim como a mortalidade (Basu *et al.*, 2001; Stahl *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 1999a; Wang *et al.*, 1999b).

Por outro lado, sabe-se que as doenças cardiovasculares (CVD – *Cardiovascular Disease*) relacionadas com arteriosclerose são a principal causa de morbilidade e mortalidade nos países desenvolvidos. As CVD podem ser reduzidas de forma significativa através da diminuição do consumo de tabaco, o controlo da hipertensão e da diabetes e o mais importante, pela deteção precoce da doença (Agarwal *et al.*, 2000; Ciccone *et al.*, 2013; Clinton, 1998; Pelissari *et al.*, 2004; World Health Organization, 2003).

Este tipo de doença inicia-se com a oxidação das lipoproteínas de baixa densidade (LDL – *Low Density Lipoprotein*), que faz parte de um processo inflamatório global, no qual se inclui stress oxidativo, disfunção endotelial e remodelação vascular (Ciccone *et al.*, 2013; Gori *et al.*, 2011; Riccioni *et al.*, 2011). Deste modo, suspeita-se que os antioxidantes naturais presentes na dieta alimentar podem inibir a modificação oxidativa das LDL e diminuir a progressão da doença cardíaca coronária humana (Goulinet *et al.*, 1997; Tapiero *et al.*, 2004; Kohlmeier *et al.*, 1997; Kritchevsky, 1999).

Através de estudos epidemiológicos verificou-se que o consumo de produtos com carotenoides permitia a prevenção deste tipo de doença. No entanto, nem todos os tipos de carotenoides apresentam um elevado potencial protetor, sendo os mais importantes o licopeno e o  $\beta$ -caroteno. Por outro lado, os estudos demonstraram que em pacientes com hábitos tabagistas, este tipo de compostos não atuam de forma positiva podendo até levar ao aumento da progressão da doença (Boeing *et al.*, 2012; Ciccone *et al.*, 2013; Collins, 2001; Cooper *et al.*, 1999; Fraser *et al.*, 2004; He *et al.*, 2007).

Por fim, a degeneração macular relacionada com a idade (AMD - *age-related macular degeneration*) é uma das principais causas de cegueira em pessoas com mais de 65 anos, o que faz com que a

qualidade de vida seja bastante afetada (Cho *et al.*, 2008; Klein *et al.*, 1995; Mangione *et al.*, 1999; Mayne, 1996; Seddon *et al.*, 1994).

A mácula do olho contém dois tipos de carotenoides, luteína e zeaxantina, sendo estes responsáveis pela coloração desse tecido. Por outro lado, pensa-se que estes compostos são responsáveis pela proteção contra os danos causados pela luz, assim como permitem a eliminação dos radicais livres presentes nos fotorrecetores (Bone *et al.*, 1997; Fraser *et al.*, 2004; Seddon *et al.*, 1994; Stahl *et al.*, 2005; Khachik *et al.*, 2002).

Através de estudos epidemiológicos verificou-se que os pigmentos maculares apresentam um efeito protetor, tendo sido encontrada uma forte associação com a luteína. Também foi possível verificar, através de um estudo de pequena intervenção (LAST – *Lutein and Antioxidant Supplementation Trial*), que a suplementação de luteína livre ou em conjunto com outros nutrientes permite melhorar a função visual de pacientes que sofrem de AMD (Schalch, 1992; Stahl *et al.*, 2005; Richer *et al.*, 2004).

### **3.2. Métodos analíticos de determinação do teor de carotenoides**

Os carotenoides são compostos muito particulares, no que diz respeito à sua estrutura química, uma vez que este tipo de estrutura permite a ocorrência de compostos quimicamente muito semelhantes e por outro lado são muito suscetíveis a reações de isomerização e oxidação, sendo muito sensíveis à luz, temperatura, oxigénio e superfícies ativas. Por esse motivo, a análise destes compostos apresenta elevada dificuldade (Dias *et al.*, 2008).

Ao longo dos tempos, muitos métodos têm sido implementados na identificação e quantificação dos carotenoides em amostras de alimentos, como métodos colorimétricos, espectrofotométricos,



fluorométricos, cromatográficos, entre outros (Gupta *et al.*, 2015; Saini *et al.*, 2015).

A cromatografia de camada fina (TLC – *Thin-Layer Chromatography*) foi a técnica utilizada na separação dos carotenoides, uma vez que, é uma técnica rápida, simples e de baixo custo. No entanto, apresenta como limitação baixa resolução. Para contornar essa limitação, foi introduzida a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC – *High-Performance Liquid Chromatography*) e atualmente estão a ser introduzidas duas melhorias significativas, sendo elas cromatografia líquida de ultra eficiência (UHPLC – *Ultra-High Performance Liquid Chromatography*) e cromatografia de camada fina bidimensional – separação de amostras em duas direções ortogonais (2D TLC – *Two Dimensional Thin-Layer Chromatography*) (Arathi *et al.*, 2015; Rodić *et al.*, 2012).

No entanto, atualmente a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) utilizando um detetor de absorção UV/Vis (em geral um detetor de fotodíodos - PDA – *Photodiode array detector*) é a técnica mais utilizada na identificação e quantificação dos carotenoides, sendo que é a técnica que permite uma melhor separação dos isómeros formados durante a análise deste tipo de compostos (Arathi *et al.*, 2015; Gupta *et al.*, 2015; Saini *et al.*, 2015).

A separação dos carotenoides por HPLC pode ser efetuada em fase normal ou em fase reversa, no entanto, a fase normal não é a mais aconselhada para o procedimento, uma vez que, este tipo de fase não permite uma boa separação entre os carotenoides não-polares. Por outro lado, o sistema de HPLC com fase reversa aumenta a interação entre o analito e a fase estacionária não-polar levando a um aumento da resolução na separação dos mesmos (Gupta *et al.*, 2015; Sander *et al.*, 2000).

Em HPLC a separação dos carotenoides pode ser realizada com colunas C<sub>18</sub> ou C<sub>30</sub> em modo isocrático ou gradiente. No entanto, preferencialmente utiliza-se a coluna C<sub>18</sub> para a separação dos

carotenoides, apesar deste tipo de coluna não ter a capacidade de resolver isómeros geométricos e de não ser eficiente a separar isómeros posicionais, como a luteína e a zeaxantina. No que diz respeito, às colunas  $C_{30}$  estas permitem resolver isómeros geométricos de forma mais eficiente mas isso requer tempos de operação mais longos para realização da separação dos carotenoides, levando à obtenção de rendimentos inferiores aos obtidos com as colunas do tipo  $C_{18}$  (Gupta *et al.*, 2015; Sander *et al.*, 2000; Rajendran *et al.*, 2005; Khachik *et al.*, 1997).

As fases móveis mais utilizadas na análise deste tipo de compostos são constituídas por solventes como o acetonitrilo (ACN) e/ou o metanol (MeOH), sendo que estes apresentam algumas modificações. No que diz respeito, ao MeOH este solvente apresenta uma maior recuperação dos carotenoides em comparação com o ACN, tem menor toxicidade, o seu custo também é menor e apresenta uma elevada disponibilidade em relação ao ACN. Por outro lado, o ACN apresenta uma viscosidade reduzida, uma baixa absorção sob a luz UV (o que permite um baixo nível de ruído na deteção UV), a pressão da coluna é inferior e o pico apresenta uma boa forma. Desse modo, o ACN é o solvente mais utilizado na análise deste tipo de compostos. (Amorim-Carrilho *et al.*, 2014; Epler *et al.*, 1992).

De forma, a aumentar a solubilidade dos compostos a analisar e a melhorar a resolução da análise, são adicionadas pequenas quantidades de um solvente menos polar, funcionando como um modificador de solvente primário. Normalmente, utilizam-se o diclorometano (DCM), tetra-hidrofurano (THF), éter metil terc-butilico (MTBE), acetato de etilo, hexano, acetona, clorofórmio e água (Amorim-Carrilho *et al.*, 2014; Rodriguez-Amaya *et al.*, 2004).

Atualmente, a análise dos carotenoides também pode ser realizada através da técnica de UHPLC (cromatografia líquida de ultra eficiência), uma vez que, este tipo de técnica apresenta vantagens significativas em relação à técnica de HPLC, no que diz respeito à

capacidade de obtenção de picos mais altos e com menor largura o que se traduz no aumento da sensibilidade e no aumento da resolução cromatográfica. Esta técnica permite economizar nos solventes das fases móveis, uma vez que, a análise é realizada com tempos de corrida inferiores aos necessários na técnica de HPLC. Atualmente, este tipo de técnica utiliza colunas  $C_{18}$  na análise de carotenoides apesar deste modelo apresentar limitações na separação dos isómeros (Bijttebie *et al.*, 2014; Gupta *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2015).

A cromatografia gasosa com espetrometria de massa (GC-MS – *Gas Chromatography-Mass Spectrometry*) é outra das técnicas utilizadas na análise dos carotenoides. No entanto, esta técnica decorre a temperatura elevada o que leva à degradação dos carotenoides e a elevados tempos de análise, sendo, por isso, menos utilizada (Arathi *et al.*, 2015).

A cromatografia de fluido supercrítico (SFC – *Supercritical Fluid Chromatography*) é um método alternativo e apelativo na determinação dos carotenoides, uma vez que, esta técnica apresenta taxas de fluxo mais elevadas e tempos de análise mais curtos em comparação com HPLC. A fase móvel mais utilizada é o  $CO_2$  (dióxido de carbono), devido à sua baixa viscosidade e elevada difusividade em relação aos líquidos convencionais, mas tem como limitação a baixa solubilidade dos carotenoides em  $CO_2$  (Li *et al.*, 2015).

Atualmente têm sido reportadas na literatura técnicas de estratégias de interface que utilizam o método de cromatografia líquida com espetrometria de massa (LC-MS – *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*) como sistema de deteção de compostos. Existem várias técnicas usadas na deteção de carotenoides no entanto, as mais comuns são a ionização química à pressão atmosférica (APCI) e a ionização por eletrospray (ESI) (Amorim-Carrilho *et al.*, 2014; Arathi *et al.*, 2015).

A APCI é uma técnica com elevada sensibilidade e é mais apropriada para a ionização de compostos não-polares, sendo usada na análise de carotenoides lipossolúveis. Por outro lado, o ESI é mais

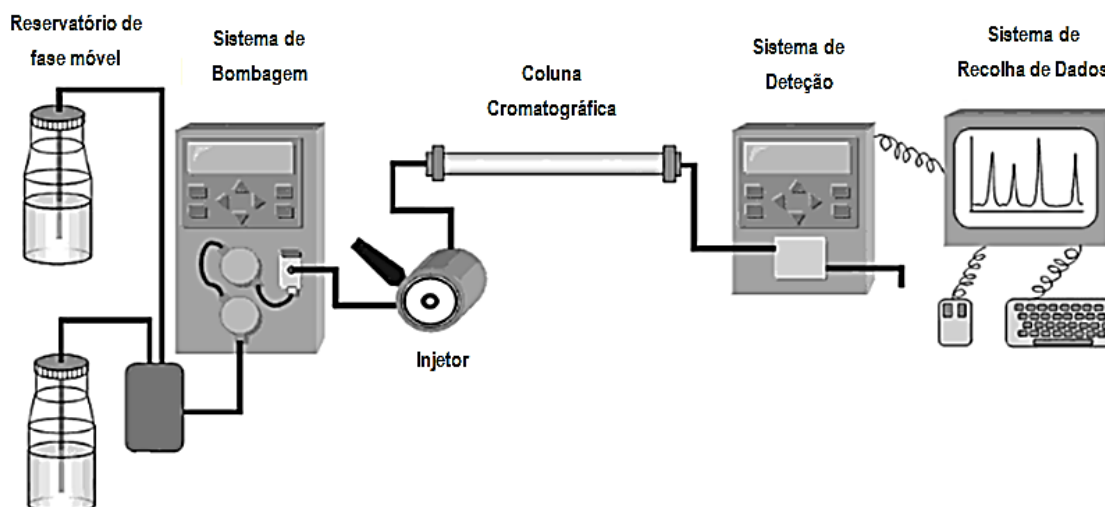
utilizado na ionização de compostos polares (Amorim-Carrilho *et al.*, 2014; Arathi *et al.*, 2015).

### **3.3. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) – princípios fundamentais**

Atualmente, a cromatografia líquida de alta eficiência, apresenta um papel indispensável na análise de amostras, assim como na determinação de constantes físicas e no isolamento de componentes purificados de misturas complexas. Desse modo, é muito utilizada nos laboratórios de análise em vários tipos de amostras, como por exemplo, produtos farmacêuticos, nutracêuticos, alimentos, cosméticos, matrizes ambientais, amostras forenses e produtos químicos industriais (Claessens *et al.*, 2004; Waters, 2016).

Esta técnica necessita de uma fase estacionária que se encontra numa coluna cromatográfica de aço inoxidável e, fase móvel líquida, sendo necessário que esta apresente um elevado grau de pureza, assim como ausência de oxigénio livre e outros gases que estejam dissolvidos na mesma, sendo por isso desgaseificada antes da sua utilização (Degani *et al.*, 1998; Waters, 2016).

O sistema de HPLC consiste num sistema de bombas, num injetor, numa coluna cromatográfica, num sistema de deteção e num sistema de recolha de dados – computador. Além deste equipamento, ainda existe um reservatório de fase móvel, a fase estacionária e a amostra. O esquema dos componentes do sistema de HPLC é apresentado na Figura 3.4 (Nollet *et al.*, 2013; Waters, 2016).



**Figura 3.4.** Esquema com os principais componentes de um sistema de HPLC (fonte: adaptado de Nollet *et al.*, 2013)

O sistema de bombas permite a condução da fase móvel para a coluna cromatográfica de forma contínua, a um caudal adequado e a pressão elevada. Este sistema também permite escolher o tipo de eluição pretendida, isocrática ou por gradiente, através da variação do caudal de fase móvel (Waters, 2016).

O sistema de injeção permite introduzir a amostra no fluxo contínuo de fase móvel na coluna cromatográfica, através de uma seringa de injeção automática (Nollet *et al.*, 2013; Waters, 2016).

A separação dos componentes das amostras realiza-se devido às diferentes interações que ocorrem entre a fase estacionária (encontra-se na coluna cromatográfica) e a fase móvel. Na maior parte dos casos, a separação ocorre à temperatura ambiente, no entanto, alguns sistemas apresentam fornos que permitem regular a temperatura a que ocorre a separação, de modo a melhorar a eficiência do processo (Ball *et al.*, 1998).

O sistema de deteção permite detetar os componentes separados através da monitorização contínua do efluente que sai da coluna

cromatográfica, isto é, os componentes que são eluídos da coluna passam por um detetor que apresenta sensibilidade para responder a alterações na concentração de todos os compostos de interesse. Os detetores mais utilizados, atualmente, são os detetores de absorção UV/Vis e de fluorescência, sendo que a sua utilização depende das características e concentrações dos analitos que são separados e analisados (Ball *et al.*, 1998).

O sistema de recolha de dados recebe o sinal que é emitido pelo detetor e procede ao registo e processamento dos dados, o que resulta na construção de um cromatograma. A identificação e quantificação de cada componente são realizadas através da comparação dos tempos de retenção e das áreas dos respetivos picos com soluções padrão cujos tempos de retenção e concentrações são conhecidos (Waters, 2016).

- **Mecanismos de separação de componentes**

Neste tipo de técnica, as separações podem ser de vários tipos dependendo da fase estacionária utilizada em cada situação. Desse modo, as separações podem ser realizadas por adsorção, partição e permuta iónica (Degani *et al.*, 1998; Waters, 2016).

Atualmente, o método de separação por partição é o mais utilizado e baseia-se na polaridade dos analitos da amostra e na sua afinidade em relação à fase móvel e estacionária (Skoog *et al.*, 2007).

Este mecanismo de separação apresenta dois tipos de separação, sendo eles a separação em fase normal (NP-HPLC) e separação em fase reversa (RP-HPLC) (Degani *et al.*, 1998; Nollet *et al.*, 2013; Waters, 2016).

Na separação em fase normal (NP-HPLC) a fase estacionária usada apresenta uma polaridade mais elevada do que a fase móvel, o que faz com que os primeiros componentes a serem eluídos da coluna cromatográfica sejam os que apresentam menor polaridade (Degani *et al.*, 1998; Nollet *et al.*, 2013; Waters, 2016).

Na separação em fase reversa (RP-HPLC) o enchimento da coluna são partículas de sílica e estas encontram-se quimicamente ligadas a uma fase estacionária não polar. Por outro lado, a fase móvel utilizada é um solvente que apresenta uma polaridade mais elevada do que a fase estacionária, o que faz com que a eluição ocorra de modo inverso à NP-HPLC. Isto é, os componentes polares separados na coluna cromatográfica são eluídos em primeiro lugar, uma vez que, estes apresentam uma maior afinidade para a fase móvel do que para a fase estacionária (essencialmente hidrofóbica) (Ball *et al.*, 1998; Degani *et al.*, 1998; Nollet *et al.*, 2013; Waters, 2016).

A RP-HPLC é a mais utilizada, uma vez que, em comparação com outras técnicas de HPLC, esta apresenta uma maior robustez, maior versatilidade, maior eficiência e reprodutibilidade. Deste modo, este tipo de separação é uma das técnicas que pode ser aplicada na separação de uma ampla gama de compostos (Layne, 2002; Snyder *et al.*, 2010).

### **3.4. Validação de um método analítico**

A validação de um método analítico diz respeito a uma confirmação, através do fornecimento de uma evidência objetiva, de que são cumpridos todos os requisitos específicos para a aplicação ou uso pretendido do método analítico. A norma que contém os requisitos específicos para a validação do método é a ISO/IEC 17025 – Requerimentos gerais para Laboratórios de Ensaio e Calibração. (Gondim *et al.*, 2011; International Standard Organization, 2005).

De uma forma resumida, a validação de um método analítico tem como objetivo demonstrar que um determinado método é indicado para o processo a que é destinado. (Ribani *et al.*, 2004):

O processo de validação de um método analítico envolve o estudo de vários parâmetros, tanto por avaliação direta como por avaliação indireta e, deverá pelo menos abranger as partes ou alterações cuja validação não tenha sido realizada por um organismo reconhecido. Deste

modo, na avaliação indireta do processo de validação encontram-se parâmetros como, especificidade/seletividade, quantificação, precisão e robustez. No caso, da avaliação direta o parâmetro que deve ser determinado é a exatidão do método analítico (Relacre, 2000).

Nem todos os parâmetros referidos são exigidos em todos os processos de validação. A escolha dos parâmetros a estudar fica dependente do tipo de método que se pretende avaliar (Junior *et al.*, 2001; Zoonen *et al.*, 1999).

### **3.4.1. Avaliação Indireta**

Este tipo de avaliação tem por base a determinação e a evidência dos seus parâmetros específicos, sendo eles a especificidade/seletividade, a quantificação, a precisão e a robustez (Guimarães *et al.*, 2007; Relacre, 2000; Ribani *et al.*, 2004).

- **Especificidade/Seletividade**

Um método analítico é seletivo quando é capaz de identificar e distinguir um determinado analito numa mistura complexa sem a ocorrência de interferências por parte de outro tipo de componente. Por outro lado, um método é específico quando apenas é capaz de obter resposta para um tipo de analito. Um método analítico pode ser considerado específico e seletivo, quando após a realização de testes de recuperação, o mesmo apresenta taxas de recuperação próximas de 100%.

- **Quantificação**

Este tópico apoia-se no estudo de vários parâmetros para o processo de validação de um método analítico, sendo eles: a curva de calibração, os limiares analíticos e a sensibilidade do método.

A curva de calibração é um processo no qual a resposta de um determinado sistema de medida se relaciona com uma concentração ou uma quantidade de substância conhecida. Para que o estudo deste



parâmetro seja completo, é necessário estudar a gama de trabalho e a linearidade do método analítico.

Os limiares analíticos são de dois tipos, limite de deteção (LD) e limite de quantificação (LQ). O limite de deteção representa o teor mínimo medido, a partir do qual é possível detetar a presença do analito em estudo com uma certeza estatística admissível. O limite de quantificação corresponde à concentração mais baixa, a partir da qual é possível quantificar o analito, com uma determinada exatidão e precisão.

A sensibilidade de um método analítico demonstra a variação da resposta em função da concentração do analito. Deste modo, este parâmetro é representado como o declive da curva de calibração e é determinado em conjunto com os testes de linearidade. Este parâmetro depende da natureza do analito e da técnica de deteção usada.

- **Precisão**

A precisão de um método analítico tem como objetivo a avaliação da dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões com condições definidas. Este parâmetro é avaliado através de três níveis diferentes, repetibilidade (concordância entre resultados de medições sucessivas de um mesmo método, realizadas sob as mesmas condições de medição), precisão intermédia (precisão avaliada sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, utilizando para tal o mesmo método, no mesmo laboratório ou em laboratórios diferentes, e tendo em conta a definição das condições que iram variar) e reprodutibilidade (precisão de um método efetuado em condições de ensaio diferentes, utilizando o mesmo método de ensaio, sobre uma mesma amostra, com variação de condições laboratoriais).

- **Robustez**

A robustez de um método analítico mede a sensibilidade que este apresenta face pequenas variações. Isto é, um método é robusto quando é praticamente insensível a pequenas variações que possam ocorrer aquando da sua execução. Este parâmetro é determinado através do teste de *Youden*. Este teste além de avaliar a robustez do método, permite seriar a influência de cada uma das variações nos resultados finais, indicando o tipo de influência de cada uma das variações.

### **3.4.2. Avaliação Direta**

A avaliação direta é essencialmente conhecida pelo parâmetro de exatidão. A exatidão corresponde à concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceite como convencionalmente verdadeiro. A avaliação da exatidão de um método analítico pode ser realizada através de vários processos, como: o uso de materiais de referência certificados, realização de ensaios de recuperação e realização de testes comparativos entre métodos (Guimarães *et al.*, 2007; Relacre, 2000).

#### **3.4.2.1. Materiais de referência certificados**

Os materiais de referência certificados (MRC) são materiais que possuem um valor de concentração (ou grandeza) certificada por uma entidade, para cada parâmetro e uma incerteza associada. Os MRC são fornecidos por organismos reconhecidos e confiáveis, como por exemplo, NIST (“National Institute of Standards and Technology” – USA), LGC (“Laboratory of the Government Chemist” – UK), USP (“Uniform Search Platform”), FAPAS (“Food Analysis Performance Assessment Scheme” – UK) e BIPEA (“Bureau Interprofessionnel d’Etudes Analytiques”) (Relacre, 2000; Ribani *et al.*, 2004).

Aquando da avaliação da exatidão através de material de referência certificado, é necessário comparar os valores obtidos (média e desvio padrão) com os valores certificados do material de referência e, para tal, pode-se utilizar vários critérios, como o erro relativo, o teste de hipóteses (teste t), índice z (z-score) e o erro normalizado (Guimarães *et al.*, 2007; Relacre, 2000). No presente trabalho a avaliação da exatidão do método foi determinado através do critério índice z (z-score).

O cálculo do índice z (z-score) é realizado através da seguinte equação:

$$z = \frac{(X_{lab} - X_v)}{s} \quad (3.1)$$

em que,

$X_{lab}$  – valor obtido pelo laboratório;

$X_v$  - valor de referência do material de referência certificado;

$s$  – valor de incerteza.

A avaliação deste parâmetro é realizada através dos seguintes critérios de decisão, que se encontram enumerados na Guia ISO/IEC 43-1:1999 (Ensaio de Proficiência por Comparações Interlaboratoriais. Parte 1: Desenvolvimento e Operação de Programas de Ensaio de Proficiência.), sendo eles (Relacre, 2000):

- $|z| \leq 2$  – resultado satisfatório;
- $2 < |z| \leq 3$  – resultado questionável;
- $|z| > 3$  – resultado insatisfatório.

#### 3.4.2.2. Ensaio de recuperação

A recuperação de um determinado analito pode ser estimada através da análise de amostras adicionadas com quantidades conhecidas

desse analito. As amostras podem ser adicionadas com o analito em três diferentes concentrações, como por exemplo, próximo ao limite de deteção, próximo à concentração máxima permissível e em uma concentração próxima à média da faixa de utilização do método. A recuperação, em percentagem, é calculada através da seguinte expressão (Guimarães *et al.*, 2007):

$$R = \frac{C_1 - C_2}{C_3} \times 100 \quad (3.2)$$

em que,

$C_1$  – concentração determinada na amostra adicionada;

$C_2$  – concentração determinada na amostra não adicionada;

$C_3$  – concentração adicionada.

#### 3.4.2.3. Testes comparativos entre métodos

Os testes comparativos entre métodos consistem na comparação entre resultados obtidos pelo método em estudo e os resultados obtidos por um método de referência, avaliando, assim, o grau de exatidão do método em testes em relação ao de referência. Deste modo, assume-se que a incerteza do método de referência é conhecida (Ribani *et al.*, 2004).

As análises são realizadas em duplicado, utilizando os dois métodos em separado, sob as mesmas amostras, em uma faixa de concentrações em que se pretende validar o método (Ribani *et al.*, 2004).

### 3.5. Amostragem

A amostragem permite a recolha de uma porção pequena de amostra que seja representativa de todo o material a analisar. Por outro lado, nos procedimentos de amostragem deve ser assegurado a não ocorrência de mudança da composição entre a colheita e a análise da amostra (Andrade *et al.*, 2008; Greenfield *et al.*, 2003).

Ao processo de amostragem está sempre associado um erro quando se procede à extrapolação dos resultados para a quantidade total de material em estudo. O erro associado ao processo de amostragem também está relacionado com a variabilidade e heterogeneidade dos produtos em análise. (Greenfield *et al.*, 2003).

Em geral, as amostras trazidas para análise apresentam elevado tamanho (volume e tamanho de partícula), sendo necessário a sua transformação em amostras de dimensões mais reduzidas de modo, a ser possível a sua análise direta. As amostras devem ser transformadas em misturas homogéneas de pequenas dimensões, que sejam representativas da totalidade da amostra inicial. Para a homogeneização são realizadas várias operações físicas, como por exemplo: corte, moagem, mistura e peneiração, assim como, métodos que permitem a redução de grandes quantidades de amostra (Rodriguez-Amaya, 2001).

O processo de amostragem pode ser realizado através de quatro métodos de amostragem, sendo eles a amostragem aleatória, a amostragem estratificada, a amostragem seletiva e a amostragem por conveniência (Greenfield *et al.*, 2003).

No presente trabalho utilizou-se a amostragem aleatória, sendo esta referenciada posteriormente no capítulo de materiais e métodos, onde se irá enumerar as diferentes etapas do plano de amostragem.

### **3.6. Avaliação da homogeneidade das amostras**

Apesar de todos os esforços realizados pelos laboratórios na preparação de materiais homogéneos para fins de estudos interlaboratoriais, os mesmos com exceção das soluções verdadeiramente bem misturadas, apresentam heterogeneidade. Deste modo, devem ser realizados testes de homogeneidade para avaliar se o material em análise é ou não homogéneo. Estes testes devem ser considerados essenciais mas apenas como salvaguarda pois não são infalíveis (Fearn *et al.*, 2001).

O teste mais utilizado para determinar a homogeneidade do material em análise é o teste de Cochran. Este teste permite verificar a existência de *outliers* nos resultados obtidos do material preparado, isto é, permite avaliar a existência de valores que sejam discrepantes no conjunto de resultados obtidos. Para este teste é determinado o valor observado,  $C$ , sendo este calculado através da equação (3.3) (Miller *et al.*, 2010; Fearn *et al.*, 2001):

$$C = \frac{D_{\text{máx}}^2}{\sum D_i^2} \quad (3.3)$$

em que,

$D_{\text{máx}}^2$  – diferença máxima quadrática;

$D_i$  – diferença entre cada par de duplicados para  $i=1, \dots, m$ , com  $m$  = número de sub-amostras.

Após a determinação do valor observado, este é comparado com o valor crítico obtido a, partir da tabela que se encontra no Anexo 1. Se o valor observado for inferior ao valor crítico, pode-se dizer que não existe qualquer evidência da existência de *outliers*, logo o material em análise apresenta homogeneidade (Miller *et al.*, 2010; Fearn *et al.*, 2001).

## 4. Materiais e métodos

O Laboratório de Química do INSA (Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, IP), acreditado pela ISO 17025, tem implementado um método de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para a determinação dos teores de carotenoides em frutos e produtos hortícolas. Este método foi validado e os principais parâmetros de validação são (Dias *et al.*, 2008):

- Linearidade - 0,05-5,0 µg/mL,  $r^2 \geq 0,995$ ;
- Sensibilidade -  $34-51 \times 10^4$  AUxminxmL/µg;
- Precisão Intermédia - 5,3-18%, sem saponificação – 2,1-12%;
- Veracidade - materiais de referência certificados BCR 485 (mistura de legumes liofilizada) e NIST 2383 (compósito de legumes e frutos cozinhados) e ensaios de aptidão (BIPEA e NFA) -  $|z - score| \leq 2$ , aceitável;
- Recuperação - 83% a 102% - sem saponificação e 65% a 85% - com saponificação;
- Limite de deteção - 12-18 pg/mL (0,58-0,92 µg/100g);
- Limite de quantificação - 35-55 pg/mL (1,8-2,8 µg/100g).

Os intervalos para o limite de deteção e quantificação dizem respeito a todos os carotenoides em análise ( $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno,  $\beta$ -criptoxantina, licopeno, luteína e zeaxantina).

Os carotenoides ( $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno,  $\beta$ -criptoxantina, licopeno, luteína e zeaxantina) que se encontram presentes nas matrizes alimentares estudadas foram extraídos utilizando uma mistura de solventes orgânicos, soluções de MeOH:THF (1:1). Os extratos obtidos das matrizes alimentares que apresentavam ésteres dos carotenoides sofreram o processo de saponificação, de modo, a obter estes compostos na forma livre. A identificação e quantificação dos analitos foi realizada através do método de HPLC de fase reversa com deteção por

DAD-UV/Vis a comprimentos de onda de 473 nm para o licopeno e 450 nm para os restantes carotenoides. A identificação foi realizada por comparação com os tempos de retenção dos respetivos padrões externos, assim como dos respetivos espectros. Por outro lado, a quantificação foi efetuada através do método do padrão externo, assim como da utilização de um padrão interno (equinenona e  $\beta$ -apo-8'-carotenal).

#### 4.1. Reagentes e Padrões

Os reagentes utilizados nas análises das matrizes alimentares em estudo foram os seguintes:

- Acetato de amónio,  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ , p.a., pureza  $\geq 98,0\%$ , Merck;
- Acetonitrilo  $\text{CH}_3\text{CN}$ , para HPLC, pureza  $\geq 99,9\%$ , CAS 75-05-8, Prolabo VWR;
- Ácido ascórbico,  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ , VWR BDH Prolabo;
- Água desionizada, mínimo grau 2 de acordo com norma EN ISO 3696, obtida a partir de um sistema de purificação Milli-Q (Millipore);
- Azoto,  $\text{N}_2$ , com mínimo de pureza 99,9990%;
- Carbonato de magnésio básico,  $4\text{MgCO}_3\text{Mg(OH)} \cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$ , p.a., Merck;
- Cloreto de sódio,  $\text{NaCl}$ , Merck;
- Diclorometano,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , para HPLC, pureza  $\geq 99,8\%$ , CAS 75-09-2, Merck;
- Etanol,  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ , p.a., pureza  $\geq 99,9\%$ , CAS 64-17-5, Merck;
- Éter de petróleo, p.a., ponto de ebulição 40-60 °C, CAS 64742-49-0, Fisher Scientific;
- Fenofaleína,  $\text{C}_{20}\text{H}_{14}\text{O}_4$ , Merck;
- Hexano,  $\text{C}_6\text{H}_{14}$ , p.a., pureza  $\geq 99,0\%$ , Merck;
- Hidróxido de potássio,  $\text{KOH}$ , lentilhas, p.a., pureza  $\geq 85,0\%$ , CAS 1310-58-3, Prolabo VWR;



- Hidroxitolueno butilado (2,6-di-ter-butil-4-metilfenol),  $C_{15}H_{24}O$ , p.a., pureza  $\geq 98,0\%$ , Panreac;
- Metanol,  $CH_3OH$ , p.a., pureza  $\geq 99,8\%$ , CAS 67-56-1, J.T.Baker;
- Metanol,  $CH_3OH$ , para HPLC, pureza  $\geq 99,9\%$ ; J.T.Baker;
- Pirogalol (1,2,3-tri-hidroxibenzeno),  $C_6H_6O_3$ , p.a., Merck;
- Sulfato de sódio anidro,  $Na_2SO_4$ , p.a., pureza  $\geq 99\%$ , Merck;
- Tetra-hidrofurano,  $C_4H_8O$ , p.a., pureza  $\geq 99,9\%$ , VWR BDH Prolabo;
- Trietilamina,  $C_6H_{15}N$ , p.a., pureza  $\geq 99\%$ , Merck;

As substâncias puras utilizadas como padrões foram as seguintes:

- $\beta$ -apo-8'-carotenal, pureza (HPLC)  $\geq 97\%$ , Sigma;
- Equinenoma, pureza (HPLC)  $\geq 98\%$ , Sigma;
- $\alpha$ -caroteno, pureza (HPLC)  $\geq 97\%$ , Sigma (0007R 28/02/2006);
- $\beta$ -caroteno, pureza (HPLC)  $\geq 96\%$ , Sigma;
- $\beta$ -criptoxantina, pureza (HPLC)  $\geq 97\%$ , CaroteNature (0055R 24/11/2005);
- Licopeno, pureza (HPLC)  $\geq 95\%$ , Biochemica (0031 15/11/2011);
- Luteína, pureza (HPLC)  $\geq 96\%$ , Sigma (X-6250 lote 072K4038);
- Zeaxantina, pureza (HPLC)  $\geq 98\%$ , CaroteNature (0119R 14/02/2006);
- All-trans-retinol (vitamina A),  $C_{20}H_{30}O$ , sintético (HPLC),  $\geq 95\%$ , Sigma (24/02/2014);
- dl- $\alpha$ -tocoferol (vitamina E),  $C_{29}H_{50}O_2$ , sintético (HPLC),  $\geq 95\%$ , Sigma (lote 44H1136 30/11/2010).

## 4.2. Material

- Ampolas de decantação
- Balões, em forma de pêra, de 250 mL para o evaporador rotativo
- Barquinhas para pesagem
- Criotubos
- Erlenmeyers de 100 e 250 mL
- Filtros de fibra de vidro
- Frascos de centrífuga
- Frasquinhos para HPLC
- Funis de Büchner
- Kitasatos de 500 mL
- Medidores de Kipp 50 mL
- Multipipeta calibrada
- Pipetas de vidro de Pasteur
- Pipetas volumétricas de volume 1, 2, 5, 10 e 25 mL, com certificado de lote
- Balões volumétricos de volume 5, 10, 25, 50, 100 e 500 mL, com certificado de lote
- Seringas e filtros de 0,45 µm para soluções orgânicas

## 4.3. Equipamento

- Agitador vai-vem horizontal, marca Qlabo, modelo KS-15
- Aparelho de ultra-sons, marca Branson, modelo 3510
- Balança analítica com resolução de 0,0001 g, marca Mettler Toledo, modelo XP 205, com precisão de 0,001 mg;
- Banho água, de temperatura regulável e equipado com sistema de refluxo, marca Trade Raypa
- Bloco de evaporação a seco, marca Barnstead Thermolyne, modelo Type 28100 Dri-Bath
- Câmara fria a temperatura de 5±3°C

- Centrífuga de temperatura e velocidade reguláveis, marca Eppendorf, modelo Centrifuge 5804-R
- Coluna analítica Vydac (cat. no. 201TP54) de fase invertida, contendo sílica polimericamente modificada com C18, 250x4,6 mm (tamanho de partícula 5  $\mu\text{m}$ , diâmetro de poro 300Å, carga de carbono 8%)
- Coluna analítica Waters Spherisorb ODS2 revestida com PEEK (Alltech, cat. no. 8161), 100x4.6mm (tamanho de partícula 5  $\mu\text{m}$ , diâmetro de poro 80Å, carga de carbono 12% carbono)
- Congelador a temperatura  $\leq -20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , marca Sanyo
- Espectrofotómetro, marca Thermo Scientific, modelo Evolution 300 LC
- Evaporador rotativo com ligação ao azoto, e pressão e temperatura do banho reguláveis, marca Büchi, modelo R-210, com ligação a azoto, com bomba de vácuo (V-700), com banho de aquecimento (B-491) e com controlador de vácuo (V-850);
- Frigorífico a temperatura  $4^{\circ}\text{C}$ , marca Miele
- Homogeneizador (ultra-turrax), marca Yellowline, modelo DI25 basic, de velocidade regulável
- Placa para agitação magnética, marca IKA Labortechnik, modelo RCT basic
- Sistema de filtração de fases móveis para HPLC, marca Vaccubrand, modelo MZ2C (230 v), 9 mbar e 1,9/2,1  $\text{m}^3/\text{h}$
- Sistema de HPLC marca Waters, modelo 717 plus, composto por um detetor de rede de díodos marca Waters, modelo 2998, detetor de fluorescência marca Waters, modelo 474, e um controlador e uma bomba marca Waters TM, modelo 600
- Sistema de ultrapurificação de água, marca Millipore, modelo Milli-Q
- Ultracongelador a temperatura  $\leq -70\text{ }^{\circ}\text{C}$ , marca Revco
- Vórtex, marca Vortex-Genie, modelo K-550-GE

## 4.4. Preparação de soluções

### 4.4.1. Fase móvel e outras soluções de trabalho

- **Solução de metanol (MeOH):tetra-hidrofurano (THF) (1:1) com 0,1% de hidroxitolueno butilado (BHT)**

Com uma proveta de 2000 mL, mediu-se 1300 mL de MeOH e 1300 mL de THF e juntou-se num frasco âmbar. Adicionou-se 2,6 g de BHT e agitou-se manualmente ou com agitador magnético até não serem visualizados quaisquer cristais na mistura. Esta solução pode ser conservada durante um ano, à temperatura de  $5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

- **Solução de éter de petróleo com 0,1% de BHT**

Num frasco âmbar com 2500 mL de éter de petróleo, adicionou-se 2,5 g de BHT e agitou-se manualmente até não se visualizar cristais na mistura. Esta solução pode ser conservada durante um ano, à temperatura de  $5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

- **Solução de cloreto de sódio (NaCl) a 10%**

Pesou-se 200 g de cloreto de sódio e colocou-se num balão volumétrico de 2000 mL. Adicionou-se água desionizada para dissolver o sal e, posteriormente, fez-se o volume do balão com água desionizada. Por fim, transferiu-se para um frasco âmbar. Esta solução pode ser conservada durante um ano, à temperatura de  $5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

- **Solução de hidróxido de potássio, a 10%, em MeOH**

Pesou-se 2 g de hidróxido de potássio (KOH) para um balão volumétrico de 20 mL. Posteriormente, adicionou-se 3 mL de água desionizada para dissolver e, fez-se o volume do balão com MeOH (p.a. – para análise). Preparou-se uma solução fresca todos os dias.

- **Solução de pirogalol em MeOH**

Pesou-se 80 mg de pirogalol para um balão volumétrico de 20 mL, dissolveu-se em MeOH e fez-se o volume do balão também com MeOH (p.a.). Preparou-se uma solução fresca todos os dias.

- **Fase móvel sem diclorometano (DCM)**

Pesou-se 2,0 g de BHT e 1,54 g de acetato de amónio em duas barquinhas diferentes. Posteriormente, mediu-se 400 mL de metanol (para HPLC) e colocou-se num frasco âmbar onde se adicionou o acetato de amónio. Agitou-se recorrendo a um agitador magnético e adicionou-se o BHT, assim como 1500 mL de acetonitrilo e 1,0 mL de trietilamina (TEA). Agitou-se novamente e filtrou-se através de um sistema de filtração com filtro de membrana de 0,45 µm. Esta solução pode ser conservada durante um ano, à temperatura de  $5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

- **Fase móvel para HPLC - eluente A – Acetonitrilo para HPLC**

- **Fase móvel para HPLC - eluente B – MeOH (contendo acetato de amónio 0,05M:DCM, 20:5, v/v, contendo 0,4% de BHT e 0,2% de trietilamina)**

Pesou-se 10 g de BHT e 7,7 g de acetato de amónio. Mediu-se 2000 mL de MeOH (HPLC) para um frasco âmbar, adicionou-se o acetato de amónio e colocou-se a agitar no agitador magnético. Em seguida, adicionou-se o BHT, 500 mL de DCM e 5 mL de trietilamina e levou-se a agitar novamente. Por fim, filtrou-se através de um sistema de filtração com filtro de membrana 0,45 µm e desgaseificou-se o filtrado no aparelho de ultra-sons durante 15 minutos. Esta solução pode ser conservada durante um ano, à temperatura de  $5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

- **Solução de ácido ascórbico a 0,5% em MeOH**

Pesou-se 0,5 g de ácido ascórbico para um balão volumétrico de 100 mL e perfez-se com MeOH (p.a.). Por fim, levou-se a agitar no agitador magnético. Preparou-se uma solução fresca todos os dias.

#### **4.4.2. Soluções de padrões internos**

- **$\beta$ -apo-8'-carotenal**

Pesou-se 2 mg do padrão  $\beta$ -apo-8'-carotenal para um balão volumétrico de 50 mL e perfez-se o volume do balão com a solução de DCM com 0,1% de BHT. Esta solução guardou-se no ultracongelador a -70 °C.

- **Equinenona**

Pesou-se 2 mg do padrão equinenona para um balão volumétrico de 50 mL e perfez-se o volume do balão com a solução de DCM com 0,1% de BHT. Esta solução guardou-se no ultracongelador a -70 °C.

#### **4.4.3. Soluções de padrões externos**

- **Soluções mãe individuais de cada carotenoide**

Começou-se por dissolver o conteúdo de cada ampola de carotenoide ( $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -criptoxantina, licopeno, luteína e zeaxantina) em DCM com 0,1% de BHT. Para ampolas de 1 mg utilizou-se balões volumétricos de 10 mL e para ampolas de 5 mg balões volumétricos de 50 mL. Posteriormente, colocou-se os balões sob azoto, selaram-se os balões volumétricos e guardaram-se no ultracongelador a -70°C.

- **Soluções padrão para determinação espectrofotométrica do teor**

Mediu-se 0,2 mL da solução mãe de cada carotenoide para 6 balões volumétricos de 10 mL, individualmente, e, posteriormente, evaporou-se o solvente com azoto. Após a evaporação, reconstituiu-se a solução com 10 mL de hexano (para o  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno,  $\beta$ -criptoxantina e licopeno) e com 10 mL de etanol (para a luteína e zeaxantina). Utilizaram-se balões volumétricos com certificado de lote.

Por fim, procedeu-se à leitura dos valores de absorvância das soluções em células de quartzo de percurso ótico 1 cm de largura e tendo em conta os comprimentos de onda apresentados no Anexo 2.

- **Soluções padrão individuais para determinação da pureza por HPLC**

Transferiu-se 0,2 mL da solução mãe de cada carotenoide para 6 balões volumétricos de 10 mL, individualmente, e completou-se o volume do balão com fase móvel sem DCM. Utilizaram-se balões volumétricos com certificado de lote.

- **Soluções padrão de trabalho (curva de calibração)**

Prepararam-se 6 soluções padrão de trabalho para a construção da curva de calibração. Estas soluções foram preparadas a partir das soluções mãe de cada carotenoide usando os volumes apresentados na Tabela 4.1, com exceção do padrão 1 que foi obtido por diluição do padrão 6. Utilizaram-se balões volumétricos com certificado de lote cujo volume foi completado com fase móvel sem DCM. Estas soluções podem ser conservadas ao abrigo da luz, sob azoto e a -70 °C durante 6 meses, à exceção do licopeno no nível 1 de concentração, que é válida apenas por um mês.

**Tabela 4.1.** Soluções padrão de trabalho (soluções padrão de diferentes concentrações de cada um dos analitos (1 a 6) –  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno,  $\beta$ -criptoxantina, licopeno, luteína e zeaxantina)

Padrão	1	2	3	4	5	6
Volume da solução mãe (mL)	0	0,25	0,20	0,30	0,40	0,50
Volume da solução padrão 6 (mL)	0,25	0	0	0	0	0
Volume balão (mL)	10	25	10	10	10	10

#### 4.5. Amostras

Analisaram-se amostras compostas de diferentes grupos alimentares conforme especificado a seguir e algumas das amostras de produtos hortícolas foram estudadas sob o ponto de vista da variabilidade com a estação do ano. Todas as amostras foram recolhidas no âmbito do projeto europeu TDSEXPOSURE, um estudo piloto com vista a harmonizar metodologias para avaliar a exposição das populações a contaminantes e/ou nutrientes. Cada amostra era constituída por 12 sub-amostras, recolhidas na região de Lisboa e representando os hábitos de consumo da população. As amostras foram analisadas na forma como são ingeridas, cozinhadas ou cruas dependendo do tipo de amostra em questão e da forma mais comum de ingestão.

As amostras analisadas foram classificadas em diferentes grupos de acordo com o sistema de classificação desenvolvido pela Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar (EFSA - *European Food Safety Authority*), FoodEx 2, sendo identificadas de seguida.



### **Grupo 3 - Gorduras e óleos animais e vegetais**

- ✓ Azeite;
- ✓ Manteiga com sal.

### **Grupo 4 - Café, cacau, chá e infusões**

- ✓ Cacau em pó, chocolate em pó.

### **Grupo 5 - Pratos Compostos**

- ✓ Açorda, açorda à alentejana, de bacalhau, de marisco, migas;
- ✓ Almôndegas;
- ✓ Arroz à valenciana;
- ✓ Arroz de bacalhau, de lulas, de peixe, de polvo, de tamboril;
- ✓ Arroz de cabidela, de frango, de pato;
- ✓ Arroz de cenoura, de ervilhas, de tomate, de vegetais, de feijão;
- ✓ Arroz de gambas, de lapas, de marisco;
- ✓ Bacalhau à brás, bacalhau à gomes de sá;
- ✓ Bacalhau com natas, desfeita de bacalhau;
- ✓ Caldo verde;
- ✓ Canja de galinha;
- ✓ Carne à bolonhesa, à jardineira, de porco à alentejana;
- ✓ Cozido à portuguesa e cozido à portuguesa com grão;
- ✓ Creme de camarão, de marisco, sopa de peixe;
- ✓ Dobrada;
- ✓ Empadão de atum, de bacalhau, de peixe;
- ✓ Feijoada, sopa à lavrador, sopa da pedra, sopa de carne;
- ✓ Francesinha;
- ✓ Hambúrguer de peru, de porco, de vaca;
- ✓ Lasanha bolonhesa e vegetariana;
- ✓ Omelete;
- ✓ Pizza de chouriço, de fiambre, de camarão, de peperoni, de frango;
- ✓ Quiche cogumelo e milho, espinafres, frango, vegetais, lorraine;

- ✓ Rancho;
- ✓ Sopa de agrião, de cenouras, de espinafres, de feijão-verde;
- ✓ Sopa de couve e feijão, ervilhas, feijão, grão com espinafres;
- ✓ Sopa de tomate;
- ✓ Sushi com peixe e algas.

#### **Grupo 7 - Peixe, produtos da pesca, anfíbios, répteis e invertebrados**

- ✓ Atum em conserva;
- ✓ Douradinhos;
- ✓ Mexilhão;
- ✓ Sardinha em conserva.

#### **Grupo 11 – Cereais e produtos à base de cereais**

- ✓ Biscoitos e bolachas;
- ✓ Bolachas de água e sal;
- ✓ Bolachas de chocolate;
- ✓ Bolo, bolo de arroz;
- ✓ Bolo, queques;
- ✓ Bolos de bolacha, caramelo, cenoura, mel, amêndoa, canela;
- ✓ Bolos de chocolate;
- ✓ Bolos de laranja, maçã, inglês, ananás, coco, noz;
- ✓ Bolos lêvados;
- ✓ Broa de milho;
- ✓ Croissants;
- ✓ Pão de leite;
- ✓ Tartes de leite condensado, natas, leite condensado e chocolate.

#### **Grupo 12 - Leguminosas, frutos secos, sementes oleaginosas e especiarias**

- ✓ Azeitona.

### **Grupo 13 - Carne e produtos cárneos**

- ✓ Borrego;
- ✓ Chouriço, alheira, paio, chourição;
- ✓ Presunto e bacon;
- ✓ Vitela, bife, costeleta.

### **Grupo 14 - Leite e produtos lácteos**

- ✓ Leite com cereais, leite com chocolate;
- ✓ Leite creme e pudim flan.

### **Grupo 15 - Produtos alternativos, substitutos, suplementos, fortificantes**

- ✓ Bebida de soja e baunilha, leite de soja;
- ✓ Soja à bolonhesa, hambúrguer de soja;.

### **Grupo 16 - Temperos, molhos e condimentos**

- ✓ Caldo de galinha, caldo de carne de vaca;
- ✓ Ketchup;
- ✓ Maionese;
- ✓ Molho cocktail, cubano, de alho, barbecue, inglês, de pimenta.

### **Grupo 18 - Açúcar, confeitaria e sobremesas doces à base de água**

- ✓ Gelatina.
- ✓ Sobremesas de chocolate;

### **Grupo 19 – Produtos hortícolas e derivados**

- ✓ Alface;
- ✓ Brócolos;
- ✓ Cebola;
- ✓ Cenoura;
- ✓ Couve-branca;
- ✓ Couve-de-Bruxelas;

- ✓ Couve-flor;
- ✓ Couve-portuguesa;
- ✓ Espargos;
- ✓ Feijão-verde;
- ✓ Grelos;
- ✓ Melancia;
- ✓ Milho;
- ✓ Nabijas;
- ✓ Pimento;
- ✓ Tomate.

#### **4.6. Plano de amostragem**

O plano de amostragem elaborado para as amostras do projeto TDSEXPOSURE (abreviadamente descritas como amostras TDS) dividiu-se em seis passos, sendo eles recolha das sub-amostras, preparação de cada sub-amostra, tratamento culinário, obtenção da parte edível, homogeneização das 12 sub-amostras para constituir a amostra TDS. A composição das amostras assim como os locais de compra foram estabelecidos previamente de acordo com um inquérito à população portuguesa (AEVPP09) e as quotas de mercado em 2014.

Em termos práticos, para constituir cada amostra TDS foram recolhidas 12 sub-amostras em supermercados na zona de Lisboa, representativas dos hábitos da população portuguesa, tanto no que se refere ao consumo como aos locais de aquisição. A segunda etapa consistia na preparação das sub-amostras em que se procedeu à lavagem e preparação tendo em conta o modo como são consumidos. As sub-amostras de tomate, foram preparadas com pele e sementes, isto é, na forma como são consumidas. Em algumas sub-amostras, como no caso dos pratos compostos, foi necessário proceder ao tratamento culinário numa cozinha exterior ao INSA. No entanto, alguns dos pratos

compostos foram adquiridos em restaurantes, tendo em conta que o número de amostras a preparar era elevado.

Posteriormente constituiu-se a amostra TDS a partir de 100 g de cada uma das sub-amostras (ou 200 g se a sub-amostra em causa fosse muito heterogénea) e procedeu-se à sua moagem num moinho de facas Retsh Grindomix GM-300. Por outro lado, algumas sub-amostras poderiam ser congeladas antes da moagem, sendo que o processo de congelação em alguns casos poderia facilitar a moagem das amostras.

Por último, procedeu-se à obtenção da amostra de TDS na forma como seria posteriormente analisada. Isto é, dividiu-se o homogeneizado em diferentes frascos de acordo com os analitos a analisar e congelou-se a -20 °C até à análise.

O plano de amostragem apresentado anteriormente não foi realizado no presente trabalho. As amostras que foram analisadas já se encontravam preparadas.

#### **4.7. Material de referência interno**

O material de referência interno utilizado no âmbito deste trabalho, foi preparado anteriormente no laboratório do INSA. (Silva, 2014) O desenvolvimento deste tipo de material, apresentou elevado interesse, uma vez que, a sua utilização poderia permitir a redução de custos associados à aquisição do material de referência certificado e, por conseguinte, a diminuição da frequência com que o material de referência certificado é utilizado. Por outro lado, também poderia permitir um melhor controlo dos resultados obtidos.

No que diz respeito à sua constituição, o material de referência interno foi preparado a partir de uma mistura de uma refeição em boião, à base de cenoura e brócolos, com polpa de tomate e pêssago em calda (Silva, 2014).

## 4.8. Preparação das amostras

Antes de se proceder à identificação e quantificação dos analitos em estudo foi necessário sujeitar as amostras a dois processos que permitissem obter resultados sobre os diferentes carotenoides. O primeiro processo foi a extração dos carotenoides da matriz alimentar para posterior análise por HPLC. Contudo este processo apenas permite extrair carotenoides na forma livre ou esterificada de matrizes alimentares que não apresentem gordura. Se apresentam gordura na sua constituição, o processo de saponificação deve ser utilizado. Este processo tem como objetivo remover a gordura existente na amostra assim como desesterificar as xantofilas de modo a permitir que durante a análise dos carotenoides por HPLC, estes sejam detetados; o método utilizado só permite quantificar carotenoide na forma livre.

### A. Extração

Pesaram-se as amostras para um erlenmeyer de 100 mL. A massa variou entre 0,5 e 10 g, dependendo do teor de carotenoides esperado e do teor de lípidos. Posteriormente, adicionou-se 1 g de carbonato de magnésio básico e 50 mL da solução de MeOH:THF com 0,1% de BHT. Adicionou-se 0,2 mL de padrão interno, equinenona (amostras com clorofila) ou  $\beta$ -apo-8'-carotenal (amostras sem clorofila).

Num balão volumétrico de 5 mL com certificado de lote, adicionou-se 0,2 mL de padrão interno e perfez-se o volume com a solução de fase móvel sem DCM.

As amostras foram extraídas recorrendo a um homogeneizador a 13500 rpm (rotações por minuto) durante 1 minuto. De seguida, lavou-se o homogeneizador com mais 50 mL da solução de MeOH:THF. Ao mesmo tempo, colocaram-se as amostras a filtrar através de um filtro de fibra de vidro, usando um kitasato e o respetivo funil de Büchner e lavou-se o bolo de filtração mais 2 vezes com 50 mL de solução de MeOH:THF.

Após a filtração, realizou-se uma extração líquido-líquido dos filtrados, através da adição de 50 mL da solução de éter de petróleo com 0,1% de BHT e de 50 mL da solução de NaCl a 10%. De seguida, adicionou-se mais 2 vezes 50 mL da solução de éter de petróleo com 0,1% de BHT e recolheram-se as fases superiores para uma pera de evaporação. Em seguida, colocaram-se as peras de evaporação no evaporador rotativo a 40 °C e à pressão de 300 mbar para evaporar o líquido. Quando o líquido estava quase evaporado reduziu-se a pressão para 40 mbar.

Compensaram-se os extratos com azoto e reconstituíram-se em 0,5 mL de DCM e 4,5 mL de fase móvel sem DCM.

Para as amostras com elevado teor de gordura a reconstituição foi feita na pera de evaporação com 0,5 mL de DCM e 3 mL de fase móvel sem DCM, retirando-se, em seguida, o conteúdo com uma pipeta de Pasteur para um balão volumétrico de 5 mL e lavou-se a pera com fase móvel, transferiu-se para o balão e perfez-se o volume do balão volumétrico com fase móvel sem DCM.

De seguida, filtram-se as soluções utilizando filtros de seringa de 0,45 µm e recorrendo a pipetas de Pasteur, colocaram-se as amostras nos frasquinhos para análise por HPLC e guardaram-se no ultracongelador à temperatura  $\leq -70$  °C até à injeção no sistema de HPLC.

## **B. Saponificação (S)**

Todas as amostras com teor de gordura e/ou com carotenoides na forma de ésteres foram saponificadas.

Desse modo, transferiu-se 2 mL dos extratos reconstituídos em A para tubos de centrífuga, colocaram-se sob azoto e guardaram-se no congelador a -20 °C até ao dia seguinte.

De seguida, evaporaram-se as amostras num bloco de evaporação a seco a 40 °C. Após evaporação, adicionou-se 0,75 mL da solução de

pirogalol em MeOH e 0,75 mL de solução de KOH, a 10%, em MeOH. Colocaram-se sob azoto e misturaram-se no vórtex. Os tubos foram colocados no agitador vai-vem horizontal durante 3 h a 250 rpm. Após a agitação procedeu-se à extração das amostras.

A extração após a saponificação foi feita do seguinte modo: adicionou-se 1,5 mL de água desionizada, compensou-se com azoto e misturou-se no vórtex. Depois, adicionou-se 3,0 mL da solução de éter de petróleo, compensou-se com azoto e voltou-se a misturar no vórtex. Posteriormente, colocou-se a agitar durante 5 minutos a 250 rpm e a centrifugar durante 2 minutos a 2000 rpm. Em seguida, transferiu-se a fase superior da amostra para outro tubo e repetiu-se a extração da fase inferior mais 2 vezes. No fim, evaporaram-se as fases superiores reunidas utilizando um bloco de evaporação a seco regulado para 40 °C.

Reconstitui-se o resíduo em 0,2 mL de DCM e 1,8 mL da fase móvel sem DCM, colocou-se o líquido nos frasquinhos utilizados na análise em HPLC e guardou-se no ultracongelador a  $\leq -70$  °C até à injeção no sistema de HPLC.

### **C. Saponificação prolongada (SP) de amostras com elevado teor de gordura (10 - 80%)**

Este passo realizou-se para amostras que apresentavam elevado teor de gordura e, em que o processo de saponificação do método implementado no laboratório não conseguiu eliminar a gordura existente na amostra.

Desse modo, para estas amostras fez-se um estudo em paralelo, transferindo-se 1 mL dos extratos reconstituídos para dois tubos de centrífuga diferentes (S e SP) e guardaram-se as amostras até ao dia seguinte no congelador a -20 °C. Ambos os tubos foram tratados com a solução de pirogalol e de KOH, como em B e, ambos foram colocados em agitação durante 3 horas a 250 rpm. Após a agitação dos tubos, foi prolongada a saponificação de um dos tubos de centrífuga durante mais uma noite em modo estático e na câmara frigorífica a aproximadamente



4 °C. O 1º tubo (S) foi tratado no próprio dia, de acordo com o método acreditado no laboratório e de modo semelhante ao referido em B.

No dia seguinte, procedeu-se à extração do 2º tubo (SP) da mesma forma que o referido em B (passo de saponificação).

#### **D. Saponificação a quente (SQ) (teor de gordura > 80%)**

Este tipo de saponificação foi realizada para as matrizes alimentares azeite e manteiga, uma vez que, as mesmas apresentavam elevado teor de gordura, não sendo possível remove-lo com o processo de saponificação descrito nem em B nem em C.

Deste modo, pesou-se 1 g da amostra para um erlenmeyer e adicionou-se 0,2 mL de padrão interno, 50 mL de solução metanólica com ácido ascórbico e 5 mL da solução de hidróxido de potássio a 60%.

Em seguida e no caso do azeite, numa primeira tentativa, colocou-se as amostras num banho de água quente a 80 °C durante 60 minutos. No entanto, como ainda apresentava gordura aqueceu-se o banho até 100 °C e colocou-se a amostra durante mais 60 minutos antes de iniciar o processo de extração e em seguida fez-se o passo de extração.

Para a amostra de manteiga, a saponificação a quente decorreu a 80 °C durante 60 minutos. No entanto, como aconteceu com o azeite, a amostra ainda apresentava alguma gordura e, por isso, aqueceu-se o banho até 100 °C e colocou-se a amostra no banho durante mais 30 minutos antes de iniciar o processo de extração e em seguida efetuou-se a extração.

A extração foi efetuada por 3 vezes com éter de petróleo (utilizando a solução de NaCl para não formar emulsão) e transferiram-se as fases superiores para outra ampola de decantação. Depois realizou-se a lavagem das fases com água. A verificação da condição de pH neutro, fez-se recorrendo a fenolftaleína na água de lavagem. De seguida, filtrou-se o volume da pera de evaporação por um filtro com sulfato de sódio anidro.

Posteriormente, procedeu-se à evaporação da amostra nas mesmas condições anteriormente referidas e procedeu-se à reconstituição da mesma com 0,5 mL de DCM e 4,5 mL de fase móvel sem DCM. Por fim, filtraram-se as amostras com filtros de seringa de 0,45  $\mu\text{m}$  e colocou-se o filtrado em frasquinhos para análise por HPLC, guardando-se no ultracongelador a temperatura  $\leq -70\text{ }^{\circ}\text{C}$  até à injeção no sistema de HPLC.

## 4.9. Análise cromatográfica das amostras

- **Condições cromatográficas**

A análise cromatográfica foi realizada recorrendo a uma fase móvel constituída por dois eluentes, sendo o eluente A acetonitrilo e o eluente B uma mistura de MeOH, contendo acetato de amónio 0,05M e DCM na proporção 20:5 (v/v), 0,4% de BHT e 0,2% de trietilamina). A eluição decorreu em gradiente conforme a Tabela 4.2.

**Tabela 4.2.** Gradiente da fase móvel

Tempo (min)	%A	%B
0	67	33
14	67	33
17	75	25
30	75	25
33	72	28
34,5	67	33

Foram utilizadas duas colunas de fase reversa ligadas em série, uma Waters Spherisorb ODS2, revestida com PEEK (Alltech, cat. no. 8161), 100x4,6 mm (tamanho de partícula 5  $\mu\text{m}$ , diâmetro de poro 80Å, carga de carbono 12% carbono) e uma Vydac (cat. no. 201TP54) contendo sílica polimericamente modificada com C18, 250x4,6 mm (tamanho de partícula 5  $\mu\text{m}$ , diâmetro de poro 300Å, carga de carbono

8%). As condições cromatográficas foram as apresentadas na Tabela 4.3.

**Tabela 4.3.** Condições cromatográficas

Caudal da bomba	Tempo de corrida	Volume de injeção (μL)	Deteção UV/VIS
1,5 mL/min	≈ 35 min	50 e 100	473 nm para o licopeno
			450 nm para os restantes carotenoides

A análise dos cromatogramas com vista à identificação e quantificação dos carotenoides presentes nas amostras foi realizada através do software “Empower” integrado no sistema de HPLC “Waters”.

As curvas de calibração utilizadas na análise dos cromatogramas foram elaboradas com o auxílio das leituras espectrofotométricas dos teores das soluções padrão (ponto 4.4.3) e através das soluções para avaliação da pureza, por HPLC, preparadas no ponto 4.4.3. O relatório de resultados das curvas de calibração encontra-se no Anexo 3.

- **Identificação e quantificação dos analitos**

Os carotenoides presentes nas amostras foram identificados por comparação dos seus tempos de retenção com os dos padrões. Para além disto, a identidade de cada analito na amostra foi confirmada por comparação do espectro do analito com o do padrão.

A quantificação dos analitos foi baseada no método do padrão externo e as curvas de calibração foram obtidas pelo método dos mínimos quadrados. Estas curvas de calibração permitem determinar o teor dos carotenoides presentes nas amostras através do software “Empower”. O teor dos analitos presentes nas amostras analisadas, C, em mg/100 g, foi determinado através da equação (4.1):

$$C = 10 \times \frac{C_{si} \times V_f}{m \times R \times d} \quad (4.1)$$

em que,

**10** – fator de conversão de unidades (conversão de µg/g para mg/100 g)

**$C_{si}$**  – teor do analito na solução de amostra analisada no cromatógrafo (µg/mL)

**$V_f$**  – volume final de reconstituição da amostra (mL)

**m** – massa da toma da amostra (g)

**R** – recuperação do padrão interno (%)

**d** – diluição/concentração realizada na solução de amostra após a reconstituição da mesma

Os valores obtidos através das curvas de calibração foram corrigidos com o valor de recuperação, R. A recuperação do padrão interno foi determinada para cada amostra através da razão entre a área do pico de padrão interno obtido no cromatograma da solução da amostra analisada e a área do pico de padrão interno obtido no cromatograma da solução individual de padrão interno, corrigidos para a mesma concentração, se for caso disso.

#### 4.10. Avaliação da diferença mínima significativa entre resultados dos estudos de sazonalidade

Após, a identificação e quantificação dos carotenoides presentes nas amostras adquiridas em duas estações do ano, outono e inverno, foi necessário verificar se as amostras apresentavam diferenças significativas entre si. Desse modo, foi determinado o valor de diferença mínima significativa (LSD – *Least Significant Difference*), sendo este apresentado pela expressão (4.2):

$$LSD = t \times s \times \sqrt{\frac{2}{n}} \quad (4.2)$$

em que:

**t** – valor t da distribuição de *Student*, 2 para o intervalo de confiança de 95%, para uma dimensão de amostra elevada;

**s** – incerteza do resultado da medição obtida através dos estudos de validação;

**n** – número de amostras.

O valor de incerteza dos estudos de validação foi obtido através da multiplicação dos valores de incerteza padrão relativa combinada de cada carotenoide pela média dos valores de teor de carotenoide presente em cada tipo de amostra analisada. Os valores de incerteza padrão relativa combinada encontram-se referidos na Tabela 4.4 e foram determinados em trabalhos anteriores realizados no Laboratório.

**Tabela 4.4.** Valores de incerteza padrão relativa combinada de cada carotenoide

	<b>Incerteza padrão relativa combinada - i (%)</b>
<b>α-caroteno</b>	15,9
<b>β-caroteno</b>	18,0
<b>β-criptoxantina</b>	16,3
<b>Licopeno</b>	13,2
<b>Luteína</b>	18,5
<b>Zeaxantina</b>	24,9

#### 4.11. Materiais de Referência

A avaliação da exatidão do método analítico foi feita através da utilização dos materiais de referência, certificado e interno. Para esta análise determinaram-se os valores de *z-score* para cada material de referência.

O *z-score* (referido no ponto 3.4.2.1) foi determinado tendo em conta os teores de carotenoides, os valores de referência e os valores de incerteza, sendo este calculado através da equação simplificada (4.3).

$$z - score = \frac{\sqrt{2} \times |V_{lab} - V_{ref}|}{2 \times inc_{lab.ref.}} \quad (4.3)$$

em que,

**V<sub>lab</sub>** – Valor do teor obtido laboratorialmente para cada carotenoide;

**V<sub>ref</sub>** – Valor do teor de referência para cada carotenoide;

**inc<sub>lab.ref.</sub>** – Valor da incerteza de medição no laboratório de referência, para cada carotenoide.

**O valor de *z-score* é aceitável entre -2 e 2.**

Os valores de referência e de incerteza necessários para a determinação do z-score do material de referência certificado NIST 2383 encontram-se referidos na Tabela 4.5.

**Tabela 4.5.** Valores de referência para o material de referência certificado NIST 2383 (Chief, 2002)

	Valor de referência (mg/kg)	Incerteza (mg/kg)
<b><math>\alpha</math>-caroteno total</b>	0,83	0,16
<b><math>\beta</math>-caroteno total</b>	3,12	0,63
<b><math>\beta</math>-criptoxantina</b>	1,38	0,31
<b>Licopeno total</b>	7,0	1,5
<b>Luteína</b>	1,16	0,33
<b>Zeaxantina</b>	0,86	0,14

De acordo com o fornecedor do material NIST 2383, os valores para o licopeno são valores de referência e não valores certificados. Este facto está relacionado com a dificuldade de análise do licopeno.

Os valores de referência para o material de referência interno são apresentados na Tabela 4.6.

**Tabela 4.6.** Valores de referência para o material de referência interno (Silva, 2014)

	Valor de Referência (mg/100 g)
<b><math>\alpha</math>-caroteno</b>	0,1688
<b><math>\beta</math>-caroteno</b>	0,5113
<b><math>\beta</math>-criptoxantina</b>	0,1935
<b>Licopeno</b>	0,9742
<b>Luteína</b>	0,0557
<b>Zeaxantina</b>	0,0459

Os valores de incerteza foram determinados tendo em conta os resultados obtidos no presente trabalho e através da incerteza expandida de 20% (Silva, 2014). Esses valores encontram-se tabelados no Anexo 4.

#### 4.12. Equivalentes de Retinol (RE)

Como referido anteriormente no ponto 3.1.4.1. a atividade dos carotenoides como vitamina A (retinol) é determinada através da sua conversão em equivalentes de retinol (RE), sendo estes obtidos através equação (4.4) em  $\mu\text{g}/100\text{ g}$ :

$$RE = \left( \frac{\text{teor de } \alpha\text{-caroteno}}{12} + \frac{\text{teor de } \beta\text{-caroteno}}{6} + \frac{\text{teor de } \beta\text{-criptoxantina}}{12} \right) \times 1000 \quad (4.4)$$



## 5. Resultados e Discussão

Os resultados apresentados para os diferentes carotenoides referem-se ao isómero *trans*, a não ser que seja especificado de outra forma.

A discussão dos resultados para a análise do teor de carotenoides em amostras do projeto TDSEXPOSURE (ponto 5.3) foi efetuada tendo em consideração o valor máximo da incerteza expandida relativa, 30%, obtida no laboratório através dos estudos de validação e, por isso, os resultados obtidos são apresentados com dois algarismos significativos. Os resultados do grupo 19 foram comparados com os valores apresentados em artigos por outros autores. Para os restantes grupos não se encontram valores na literatura que permitissem a comparação. Todos os resultados apresentados neste ponto foram corrigidos com as taxas de recuperação, sendo o modo de determinação referenciado no ponto 4.9.

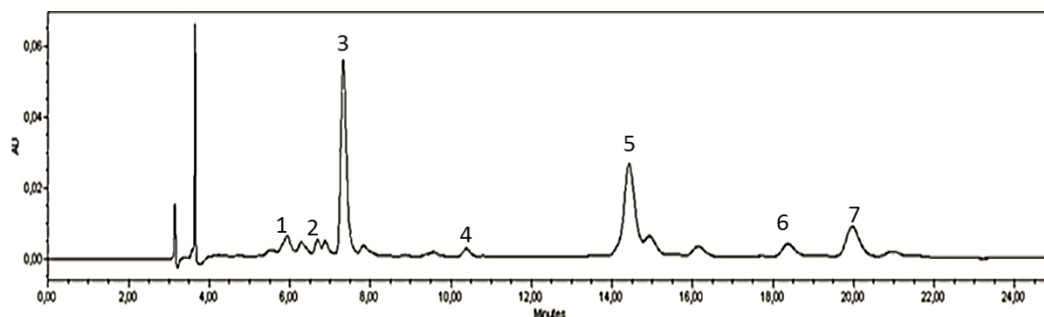
Para o estudo do efeito de sazonalidade (5.3.2) em amostras de produtos hortícolas foi calculada a diferença mínima significativa (LSD) através da equação (4.2) tendo como base as incertezas dos resultados das medições analíticas, a um nível de significância de 5% que se apresentam no Anexo 5 para as diferentes matrizes alimentares.

### 5.1. Avaliação do desempenho do método

De forma a avaliar periodicamente o desempenho do método já previamente validado, procedeu-se à análise de dois tipos de material de referência, sendo eles, o material de referência certificado adquirido pelo laboratório (NIST 2383) e o material de referência interno preparado anteriormente no âmbito do trabalho.

### 5.1.1. Material de Referência Certificado (NIST 2383)

O material de referência certificado analisado no presente trabalho foi o NIST 2383, e o seu cromatograma apresenta-se na Figura 5.1.



**Figura 5.1.** Cromatograma do material certificado NIST 2383 com os respetivos carotenoides presentes – (1) luteína (tr = 5,928 min); (2) zeaxantina (tr = 6,271 min); (3)  $\beta$ -apo-8'-carotenal (tr = 7,306 min); (4)  $\beta$ -criptoxantina (tr = 10,342 min); (5) licopeno (tr = 14,396 min); (6) –  $\alpha$ -caroteno (tr = 18,363 min); (7)  $\beta$ -caroteno (tr = 19,958 min)

Os valores obtidos para o material de referência certificado NIST 2383 para os carotenoides estão referidos nas Tabelas 5.1 e 5.2; para os carotenoides pertencentes ao grupo dos carotenos ( $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno e licopeno) os resultados apresentados são os que se obtêm sem o passo de saponificação, por se tratar de compostos que não estão esterificados. Por outro lado, para os carotenoides pertencentes ao grupo das xantofilas ( $\beta$ -criptoxantina, luteína e zeaxantina) os resultados foram obtidos após o processo de saponificação, por se tratar de compostos que podem estar esterificados.

De forma, a verificar se os resultados obtidos estão concordantes com os de referência, foi calculado o valor de *z-score* para cada um dos carotenoides estudados (equação 4.3). Para a determinação do *z-score* foi necessário obter os teores totais do  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno e licopeno, sendo estes obtidos através da soma dos teores dos seus isómeros *cis* e *trans*, sendo apresentados na Tabela 5.1.

**Tabela 5.1.** Teores totais do  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno e licopeno nas amostras de material de referência certificado (NIST 2383)

Amostras	Teor de Carotenoides (mg/100 g)								
	$\alpha$ -caroteno			$\beta$ -caroteno			Licopeno		
	<i>trans</i>	<i>cis</i>	total	<i>trans</i>	<i>cis</i>	total	<i>trans</i>	<i>cis</i>	total
15	0,053	ND	0,053	0,17	0,041	0,21	0,18	0,18	0,36
16	0,052	ND	0,052	0,16	0,040	0,20	0,34	0,081	0,42

ND – Não detetado (limite de deteção &lt; 0,0009 mg/100 g)

No caso da  $\beta$ -criptoxantina, luteína e zeaxantina, foram utilizados apenas os teores do isómero *trans*, já que os valores certificados eram apenas para estes isómeros.

**Tabela 5.2.** Teores do isómero *trans* da  $\beta$ -criptoxantina, luteína e zeaxantina nas amostras de material de referência certificado (NIST 2383)

Amostras	Teor de Carotenoides (mg/100 g)		
	$\beta$ -criptoxantina	Luteína	Zeaxantina
15	0,093	0,12	0,086
16	0,15	0,12	0,092

(limite de deteção &lt; 0,0009 mg/100 g)

Os valores de *z-score* determinados para cada carotenoide são apresentados na Tabela 5.3.

**Tabela 5.3.** Valores de *z-score* para cada carotenoide presente na amostra de material de referência certificado (NIST 2383)

Amostras	<i>z-score</i>					
	$\alpha$ -caroteno	$\beta$ -caroteno	$\beta$ -criptoxantina	Licopeno	Luteína	Zeaxantina
15	1,3	1,0	1,0	1,6	0,0	0,0
16	1,4	1,3	0,2	1,3	0,1	0,3

Tendo em conta o intervalo de valores no qual o Iz-score é aceitável (0 a 2), verifica-se pela Tabela 5.3. que todos os valores se encontram dentro do intervalo admissível para o z-score. Isso permite concluir que os resultados obtidos no presente trabalho se encontram concordantes com os valores certificados para este material de referência e que por isso as condições do método/técnico de análise tiveram um desempenho adequado.

Os valores de incerteza para o material de referência certificado (Anexo 6) são relativamente elevados, variam entre 16,3 % (zeaxantina) e 28,5 % (luteína), o que põe em evidência a dificuldade de análise dos carotenoides mesmo em laboratórios de referência para análise dos carotenoides.

### 5.1.2. Material de Referência Interno

O material de referência interno analisado foi preparado, anteriormente, no laboratório. Do mesmo modo, que para o material de referência certificado NIST 2383 também foram preparadas e analisadas duas tomas da mesma amostra (duplicados). Os resultados estão referidos na Tabela 5.4. Da mesma forma que para o material de referência certificado os resultados para o grupo dos carotenos foi obtido sem o processo de saponificação. Por outro lado, os resultados para o grupo das xantofilas foram valores obtidos após o processo de saponificação.

**Tabela 5.4.** Teor de carotenoides no material de referência interno

Amostras	Teor de Carotenoides (mg/100 g)					
	$\alpha$ -caroteno	$\beta$ -caroteno	$\beta$ -criptoxantina	Licopeno	Luteína	Zeaxantina
1	0,14	0,59	0,18	2,4	0,073	ND
2	0,18	0,77	0,26	1,9	0,11	ND

ND – Não Detetado (limite de deteção < 0,0009 mg/100 g)

Apesar de análises anteriores evidenciarem a presença de zeaxantina nesta amostra, nestes ensaios não foi possível detetá-la. Este facto poderá ser devido ao material conter baixos teores de luteína e zeaxantina e com a dificuldade de separação destes isómeros, o que foi agravado por o sistema de HPLC apresentar alguns problemas de desgaste que posteriormente foram corrigidos.

Como realizado para o material de referência certificado, foi determinado o valor de *z-score*, através da equação (4.3), para cada um dos carotenoides estudados. Neste caso utilizou-se os valores de incerteza obtido no âmbito da validação do método, sendo de 20% (Silva, 2014) e os resultados apresentam-se na Tabela 5.5. Os valores de incerteza necessários para a determinação de *z-score* encontram-se tabelados no Anexo 4 e, os valores de referência encontram-se na Tabela 4.6.

**Tabela 5.5.** *z-score* para o material de referência interno

Amostras	<i>z-score</i>				
	$\alpha$ -caroteno	$\beta$ -caroteno	$\beta$ -criptoxantina	Licopeno	Luteína
1	0,9	0,5	0,2	2,1	0,8
2	0,3	1,2	0,9	1,7	1,8

Através dos valores de *z-score* apresentados na Tabela 5.5 e tendo em conta o intervalo de 0 a 2 no qual o *|z-score|* é aceitável, verifica-se que todos os valores se encontram dentro do intervalo admissível para o *z-score*, o que permite afirmar que os resultados estão de acordo com os valores de referência obtidos anteriormente no laboratório do INSA. O valor do licopeno numa das amostras foi ligeiramente superior a 2 (2,1) mas ainda assim é inferior a 3, o que está relacionado com a dificuldade de análise deste analito, nomeadamente no que se refere à sua instabilidade e facilidade de isomerização durante o processo de análise.

## 5.2. Estudo da homogeneidade de amostra

As amostras analisadas durante este estudo foram recolhidas no âmbito do projeto TDSEXPOSURE. Tendo em consideração que determinados alimentos são por natureza heterogéneos escolheu-se a amostra de tomate para evidenciar que o processo de homogeneização foi o adequado, uma vez que o tomate é constituído pela polpa, pele e pequenas sementes, que dificultam o referido processo.

Foram analisadas em duplicado doze sub-amostras da amostra de tomate homogeneizada. Os resultados são apresentados na Tabela 5.6. Para a avaliação da homogeneidade da amostra foi utilizada a folha de cálculo, apresentada no Anexo 7, que se baseia na comparação da variância obtida para os duplicados com a variância obtida entre sub-amostras (ANOVA). As representações gráficas dos resultados dos testes de homogeneidade apresentam-se no Anexo 8.

**Tabela 5.6.** Teores de  $\beta$ -caroteno, licopeno e luteína nas amostras de tomate

Amostras	Teor de $\beta$ -caroteno (mg/kg)		Teor de licopeno (mg/kg)		Teor de luteína (mg/kg)	
	1	2	1	2	1	2
1	4,86	4,75	_____	28,63	_____	_____
2	4,80	5,07	25,89	26,31	_____	_____
3	4,08	_____	22,02	27,77	_____	_____
4	4,35	6,35	_____	33,28	10,04	8,86
5	5,57	5,92	33,64	38,28	_____	_____
6	4,09	4,63	32,67	35,35	8,52	7,49
7	4,82	6,11	34,75	27,53	_____	_____
8	4,62	5,67	31,60	39,91	9,84	8,73
9	_____	_____	_____	39,76	11,94	10,04
10	4,56	_____	29,37	39,63	7,58	8,05
11	5,22	6,68	32,17	31,95	7,83	7,31
12	4,82	5,26	28,74	34,78	8,98	10,54

De modo, a obter homogeneidade para cada carotenoide foram desprezados alguns valores como é possível verificar na Tabela 5.6, estando em conformidade com o que é preconizado pelo teste de

Cochran. Na Tabela 5.7 são apresentados os valores observados para os três carotenoides em estudo e os respetivos valores críticos obtidos pelo teste de Cochran.

**Tabela 5.7.** Valores observados na amostra de tomate e respetivos valores críticos

	Valor observado	Valor crítico
<b><math>\beta</math>-caroteno</b>	0,366	0,540
<b>Licopeno</b>	0,387	0,801
<b>Luteína</b>	0,370	0,788

Após a análise dos resultados foi possível verificar que para os três carotenoides presentes na amostra de tomate os valores observados no teste de Cochran são inferiores aos valores críticos obtidos e, por isso, foi possível concluir que não existem resultados discrepantes do conjunto de resultados obtidos para os diferentes carotenoides, isto é, não existem *outliers*. Desse modo, verificou-se que a amostra de tomate era homogénea para o  $\beta$ -caroteno, licopeno e luteína utilizando amostras de 1 g às quais foram aplicados os métodos de homogeneização e analítico em estudo.

Estes resultados permitiram uma maior confiança nos resultados obtidos para as restantes amostras em análise, uma vez que o processo de moagem/homogeneização utilizados para a amostra de tomate foi o mesmo que se usou para as restantes amostras, sendo de destacar que a amostra de tomate era naturalmente heterogénea, apresentava dificuldades de homogeneização e que as tomas de amostras sólidas são sempre superiores a 1 g.

### **5.3. Análise do teor de carotenoides em amostras do projeto *TDSExposure***

No âmbito do projeto *TDSExposure*, foram analisadas amostras de alimentos representativas do consumo pela população portuguesa. No âmbito deste trabalho analisaram-se diferentes amostras (88) de acordo com o referido em 4.5. Estas amostras foram preparadas como referido anteriormente no ponto 4.8 e foram analisadas pela técnica de HPLC segundo as condições referidas no ponto 4.9.

#### **5.3.1. Amostras não sazonais**

Após o procedimento analítico, os resultados finais foram obtidos através das folhas de cálculo que se encontram referidas no Anexo 9. Todos os resultados foram corrigidos com base na recuperação do padrão interno utilizado ( $\beta$ -apo-8'-carotenal ou equinenona), sendo esta determinada como se explica no ponto 4.9.

Os resultados obtidos foram agrupados de acordo com o sistema de classificação de alimentos desenvolvido pela EFSA (*European Food Safety Authority*) *FoodEx2*. As amostras analisadas correspondem a alimentos classificados em 12 grupos diferentes do sistema *FoodEx2* (20 grupos de alimentos).

Como referido anteriormente no ponto 4.8, foram realizados diferentes processos de saponificação dependendo do teor de gordura de cada amostra em análise. Desse modo, em amostras com um teor de gordura superior a 80% procedeu-se à saponificação a quente (SQ). No caso de amostras com um teor de gordura elevado, entre 10 e 80% procedeu-se à saponificação prolongada, isto é, a saponificação ocorreu durante um período de pelo menos 18 h (SP), à temperatura ambiente; para estas amostras também se realizou em paralelo o processo de saponificação já implementado no laboratório (S). Para as restantes amostras, realizou-se a saponificação (S) do método implementado no



laboratório e referida anteriormente no ponto 4.8. B. Para todas as amostras foi realizado o processo de extração referido no procedimento analítico implementado no laboratório (ponto 4.8. B).

As matrizes alimentares analisadas pertencentes ao **grupo 3 – gorduras e óleos animais e vegetais** foram o azeite e a manteiga. Este tipo de amostras apresenta elevados teores de gordura e, por isso, o processo de saponificação do método implementado no laboratório não permitiu a saponificação de toda a gordura. Por isso, foi necessário recorrer à saponificação a quente (SQ) das amostras de azeite e de manteiga. Com a implementação destas alterações ao processo de saponificação foi possível saponificar estes dois tipos de matriz alimentar. No caso do azeite a análise foi realizada em duplicado (SQ-1 e SQ-2) e, a saponificação ocorreu durante duas horas a uma temperatura de 100 °C e, de seguida procedeu-se à extração. Por outro lado a amostra de manteiga foi saponificada durante uma hora e meia a uma temperatura de 100 °C, seguida do processo de extração. Os teores de carotenoides determinados nos alimentos do grupo 3 e respetivas recuperações apresentam-se na Tabela 5.8.

**Tabela 5.8.** Teor de carotenoides nas amostras do grupo 3 e respetivas recuperações

Amostras		Teor de Carotenoides (mg/100 g)						Recuperação (%)
		$\alpha$ -caroteno	$\beta$ -caroteno	$\beta$ -criptoxantina	Licopeno	Luteína	Zeaxantina	
Azeite	SQ-1	ND	0,11	ND	ND	0,12	ND	58
	SQ-2	ND	0,11	ND	ND	0,13	ND	59
Manteiga com sal	SQ	ND	0,31	ND	ND	(0,0014)*	ND	53

**SQ-1** – Saponificação a quente – 1; **SQ-2** – Saponificação a quente – 2; **SQ** – Saponificação a quente; **ND** – Não detetado (limite de deteção < 0,0009 mg/100 g);

**()\*** - abaixo do limite de quantificação (0,003 mg/100 g)

Através da análise dos resultados obtidos, verificou-se que o  $\beta$ -caroteno e a luteína foram detetados e quantificados no azeite no qual se encontravam em teores semelhantes. Na manteiga com sal apenas foi possível quantificar  $\beta$ -caroteno. Apesar da luteína ter sido detetada na manteiga, o teor encontrado foi inferior ao limite quantificação do método.

Do **grupo 4 – café, cacau, chá e infusões** foi analisado o cacau em pó, chocolate em pó. Por se tratar de uma amostra que apresentava gordura, foi necessário realizar um processo de saponificação diferente do método implementado no laboratório, que permitisse eliminar a gordura existente na amostra. Desse modo realizou-se a saponificação prolongada (SP) em paralelo com o processo de saponificação do método implementado no laboratório (S), com agitação a 250 rpm durante 3 horas. Os resultados obtidos e respetivas recuperações apresentam-se na Tabela 5.9 e de acordo com os resultados, na amostra de cacau em pó, chocolate em pó não foi detetado qualquer dos carotenoides em estudo.

**Tabela 5.9.** Teor de carotenoides nas amostras do grupo 4 e respetivas recuperações

Amostra		Teor de Carotenoides (mg/100 g)						Recuperação (%)
		$\alpha$ -caroteno	$\beta$ -caroteno	$\beta$ -criptoxantina	Licopeno	Luteína	Zeaxantina	
Cacau em pó, chocolate em pó	SS	ND	ND	ND	ND	ND	ND	67
	S	ND	ND	ND	ND	ND	ND	34
	SP	ND	ND	ND	ND	ND	ND	32

**SS** – Sem saponificação; **S** – Saponificação; **SP** – Saponificação prolongada; **ND** – Não detetado (limite de deteção < 0,0009 mg/100 g)

No caso do **grupo 5 – pratos compostos** foram analisadas 28 matrizes alimentares, em que 9 são referentes a pratos à base de carne (ex. dobrada), 5 à base de peixe (ex. bacalhau à Brás e bacalhau à Gomes de Sá), 5 à base de arroz (ex. arroz de gambas), 1 à base de ovos (omelete), 2 à base de cereais (ex. pizza) e 6 de sopa (ex. caldo verde).

Como se tratava de amostras que continham gordura, foi realizado além do passo de extração o passo de saponificação. No entanto para 3 (cozido à portuguesa; sushi com peixe e algas e bacalhau à Brás) das 28 amostras o processo de saponificação do método implementado no laboratório não foi suficiente para eliminar a gordura existente. Desse modo, foi necessário realizar o processo de saponificação prolongado (SP) em paralelo com a saponificação do método implementado no laboratório, com agitação a 250 rpm durante 3 horas. Para as restantes amostras procedeu-se à saponificação segundo o método implementado, conforme referido no ponto 4.8. B.

Os resultados obtidos para os pratos à base de carne apresentam-se na Tabela 5.10, assim como as respetivas recuperações.

**Tabela 5.10.** Teor de carotenoides nas amostras do grupo 5 – Pratos à base de carne e respetivas recuperações

Amostras		Teor de Carotenoides (mg/100 g)						Recuperação (%)
		$\alpha$ -caroteno	$\beta$ -caroteno	$\beta$ -criptoxantina	Licopeno	Luteína	Zeaxantina	
Dobrada	SS	0,025	0,054	ND	ND	0,0079	ND	97
	S	0,023	0,059	ND	ND	0,0035	ND	91
Cozido à portuguesa <sup>a</sup>	SS	0,014	0,036	ND	ND	0,046	ND	80
	S	0,018	0,042	ND	ND	0,032	ND	37
	SP	0,018	0,045	ND	ND	0,033	ND	35
Feijoada <sup>b</sup>	SS	0,049	0,12	ND	ND	0,097	ND	77
	S	0,052	0,11	ND	ND	0,054	ND	68
Carne à bolonhesa <sup>c</sup>	SS	0,026	0,082	ND	ND	0,073	ND	78
	S	0,026	0,079	ND	ND	0,039	ND	67
Hambúrguer <sup>d</sup>	SS	ND	ND	ND	ND	ND	ND	55
	S	ND	ND	ND	ND	ND	ND	56
Almôndegas	SS	ND	ND	ND	0,0000	0,37	ND	85
	S	ND	ND	ND	0,014	0,44	ND	70
Lasanha <sup>e</sup>	SS	ND	0,071	ND	0,25	0,19	ND	87
	S	ND	0,084	ND	0,30	0,12	ND	68
Francesinha	SS	ND	ND	ND	ND	ND	ND	77
	S	ND	ND	ND	ND	ND	ND	66
Rancho	SS	ND	ND	ND	ND	ND	ND	85
	S	ND	ND	ND	ND	ND	ND	70

**SS** – Sem saponificação; **S** – Saponificação; **SP** – Saponificação prolongada; **ND** – Não Detetado  
(limite de deteção < 0,0009 mg/100 g)

<sup>a</sup> Cozido à portuguesa e cozido à portuguesa com grão;

<sup>b</sup> Feijoada, sopa à lavrador, sopa da pedra, sopa de carne;

<sup>c</sup> Carne à bolonhesa, à jardineira, de porco à alentejana;

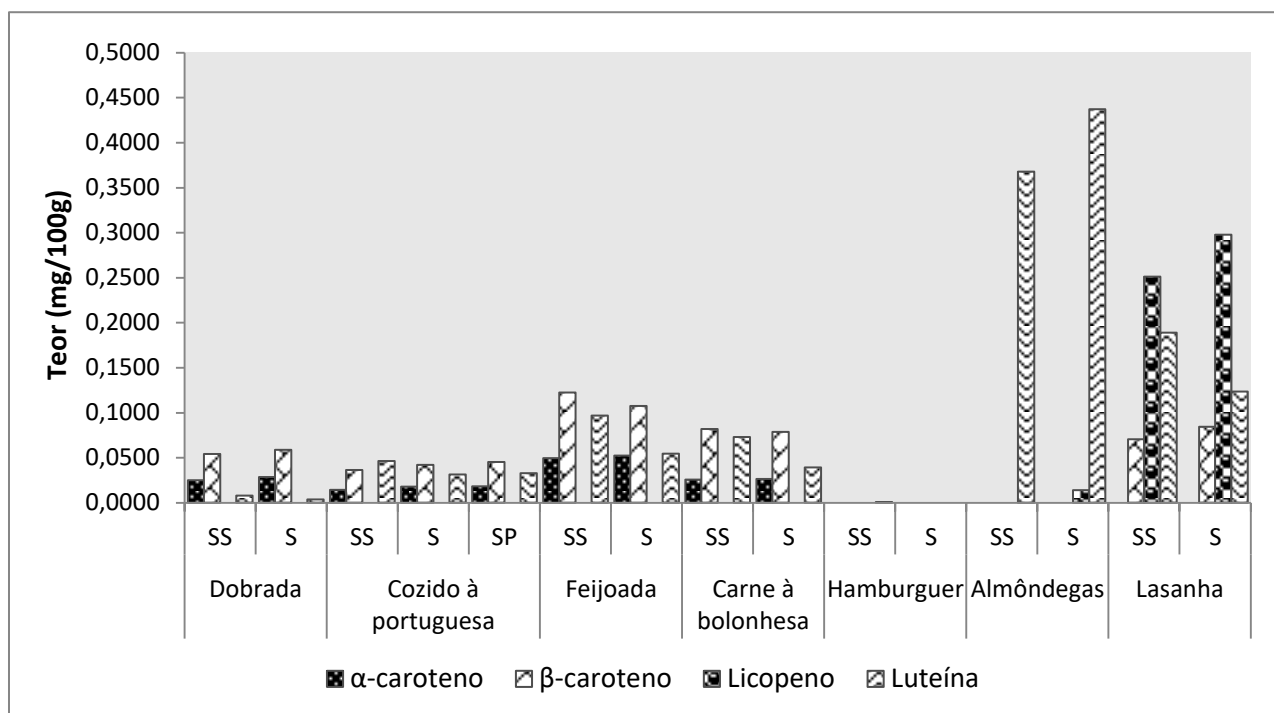
<sup>d</sup> Hambúrguer de peru, de porco, de vaca;

<sup>e</sup> Lasanha bolonhesa e vegetariana.

Através dos resultados obtidos, verifica-se que os carotenoides que foram detetados na maioria destas nove amostras são o  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno e luteína. No caso do licopeno, este apenas foi quantificado nas amostras de almôndegas e lasanha. Por outro lado, a  $\beta$ -criptoxantina e a zeaxantina não foram detetadas em nenhuma das amostras referidas.

Nas amostras de hambúrguer, francesinha e rancho não foram detetados nenhum dos seis carotenoides em estudo.

Para uma análise comparativa mais fácil foi elaborado um gráfico de barras (Figura 5.2) que permite visualizar as diferenças de teores dos carotenoides com e sem os processos de saponificação.



**Figura 5.2.** Teor de carotenoides nas amostras do grupo 5 – Pratos à base de carne (SS – Sem saponificação; S – Saponificação; SP – Saponificação prolongada)

Por outro lado, os resultados obtidos para as amostras do grupo 5 à base de peixe apresentam-se na Tabela 5.11, assim como as respetivas recuperações obtidas nos diferentes processos a que as amostras foram sujeitas.

**Tabela 5.11.** Teor de carotenoides nas amostras do grupo 5 – Pratos à base de peixe e respetivas recuperações

Amostras		Teor de Carotenoides (mg/100 g)						Recuperação (%)
		$\alpha$ -caroteno	$\beta$ -caroteno	$\beta$ -criptoxantina	Licopeno	Luteína	Zeaxantina	
Bacalhau com natas <sup>a</sup>	SS	ND	ND	ND	ND	0,060	0,039	83
	S	ND	ND	ND	ND	0,033	ND	78
Sushi com peixe e algas	SS	ND	0,050	0,010	ND	0,63	ND	93
	S	ND	0,058	0,010	ND	0,83	ND	39
	SP	ND	0,058	0,010	ND	0,74	ND	39
Açorda <sup>b</sup>	SS	ND	ND	ND	ND	ND	ND	85
	S	ND	ND	ND	ND	ND	ND	70
Bacalhau à brás <sup>c</sup>	SS	ND	ND	ND	ND	ND	ND	61
	S	ND	ND	ND	ND	ND	ND	33
	SP	ND	ND	ND	ND	ND	ND	28
Empadão de atum <sup>d</sup>	SS	ND	ND	ND	ND	ND	ND	94
	S	ND	ND	ND	ND	ND	ND	70

**SS** – Sem saponificação; **S** – Saponificação; **SP** – Saponificação prolongada; **ND** – Não Detetado  
(limite de deteção < 0,0009 mg/100 g)

<sup>a</sup> Bacalhau com natas, desfeita de bacalhau;

<sup>b</sup> Açorda, açorda à alentejana, de bacalhau, de marisco, migas;

<sup>c</sup> Bacalhau à brás, bacalhau à gomes de sá;

<sup>d</sup> Empadão de atum, de bacalhau, de peixe.

Pelos resultados obtidos, verifica-se que os carotenoides detetados nas amostras analisadas foram o  $\beta$ -caroteno, a  $\beta$ -criptoxantina, a luteína e a zeaxantina. O  $\alpha$ -caroteno e o licopeno não foram detetados em nenhuma das amostras analisadas. Nas matrizes alimentares açorda, bacalhau à brás e empadão de atum não foram detetados nenhum dos carotenoides estudados. Na amostra de sushi foi encontrado o teor de luteína mais elevado.

De modo semelhante os resultados obtidos para os pratos à base de arroz pertencentes ao grupo 5 e as suas recuperações apresentam-se na Tabela 5.12. Além da tabela com os resultados foi ainda elaborado

um gráfico de barras (Figura 5.3) que permite uma análise mais direta na comparação dos diferentes resultados.

**Tabela 5.12.** Teor de carotenoides nas amostras do grupo 5 – Pratos à base de arroz e respetivas recuperações

Amostras		Teor de Carotenoides (mg/100 g)						Recuperação (%)
		$\alpha$ -caroteno	$\beta$ -caroteno	$\beta$ -criptoxantina	Licopeno	Luteína	Zeaxantina	
Arroz de gambas <sup>a</sup>	SS	ND	0,045	ND	0,049	0,040	ND	100
	S	ND	0,051	ND	0,052	0,037	ND	90
Arroz de bacalhau <sup>b</sup>	SS	ND	0,046	ND	0,099	0,29	ND	85
	S	ND	0,051	ND	0,088	0,34	ND	70
Arroz à valenciana	SS	0,21	0,47	ND	ND	0,12	ND	90
	S	0,17	0,39	ND	ND	0,087	ND	84
Arroz de cenoura <sup>c</sup>	SS	ND	0,10	ND	0,025	0,37	ND	85
	S	ND	0,10	ND	0,0043	0,45	ND	70
Arroz de cabidela <sup>d</sup>	SS	ND	ND	ND	ND	ND	ND	85
	S	ND	ND	ND	ND	0,061	ND	70

**SS** – Sem saponificação; **S** – Saponificação; **ND** – Não Detetado (limite de deteção < 0,0009 mg/100 g)

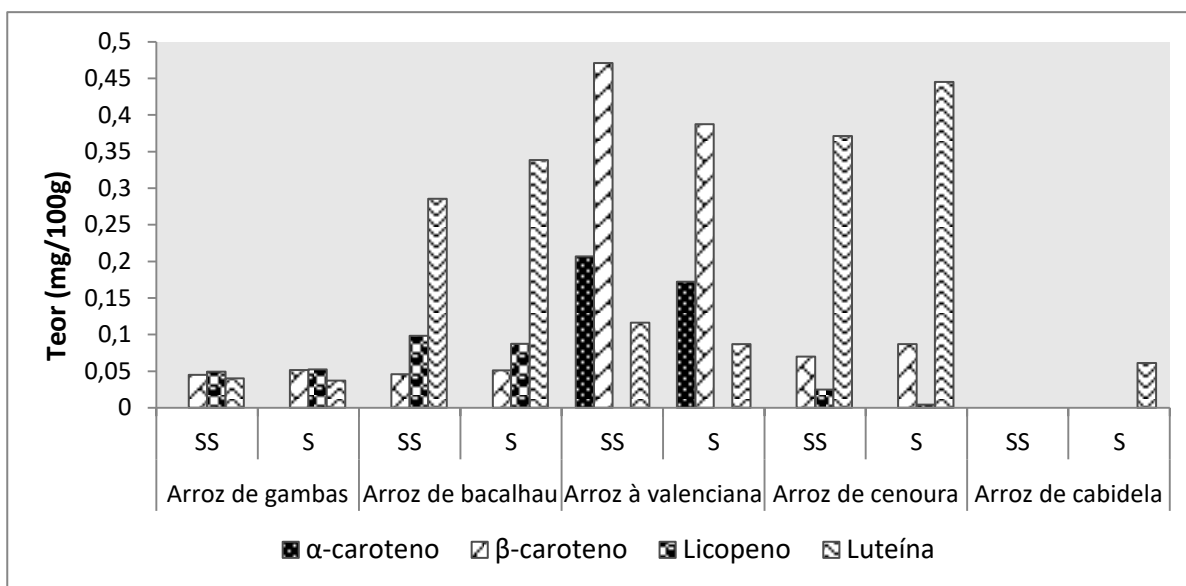
<sup>a</sup> Arroz de gambas, de lapas, de marisco,

<sup>b</sup> Arroz de bacalhau, de lulas, de peixe, de polvo, de tamboril;

<sup>c</sup> Arroz de cenoura, de ervilhas, de tomate, de vegetais, de feijão;

<sup>d</sup> Arroz de cabidela, de frango, de pato.

Pelos resultados obtidos, verificou-se que os carotenoides que são detetados na maioria das amostras são o  $\beta$ -caroteno, licopeno e a luteína. No caso do  $\alpha$ -caroteno, este foi quantificado apenas na amostra de arroz à valenciana. Por outro lado, a  $\beta$ -criptoxantina e a zeaxantina não foram detetados em nenhuma das amostras analisadas.



**Figura 5.3.** Teor de carotenoides nas amostras do grupo 5 – Pratos à base de arroz (SS – Sem saponificação; S – Saponificação)

Para os pratos à base de ovos e cereais, também pertencentes ao grupo 5 apresentam-se os seus resultados na Tabela 5.13, assim como as respetivas recuperações obtidas para cada amostra.

**Tabela 5.13.** Teor de carotenoides nas amostras do grupo 5 – Pratos à base de ovos e de cereais e respetivas recuperações

Amostras		Teor de Carotenoides (mg/100 g)						Recuperação (%)
		α-caroteno	β-caroteno	β-criptoxantina	Licopeno	Luteína	Zeaxantina	
Omelete	SS	ND	ND	ND	ND	0,32	0,025	45
	S	ND	ND	ND	ND	0,10	0,072	57
Pizza <sup>a</sup>	SS	ND	0,042	ND	0,35	0,057	ND	71
	S	ND	0,048	ND	0,43	0,027	ND	66
Quiche <sup>b</sup>	SS	ND	ND	ND	ND	ND	ND	70
	S	ND	ND	ND	ND	ND	ND	59

SS – Sem saponificação; S – Saponificação; ND – Não Detetado (limite de deteção < 0,0009 mg/100 g)

<sup>a</sup> Pizza de chouriço, de fiambre, de camarão, de peperoni, de frango;

<sup>b</sup> Quiche cogumelo e milho, espinafres, frango, vegetais, lorraine.



Pelos resultados obtidos, verificou-se que a luteína foi quantificada na maioria das amostras analisadas. Por outro lado, o  $\beta$ -caroteno, o licopeno e a zeaxantina apenas foram detetados e quantificados em uma das amostras deste sub-grupo. O  $\alpha$ -caroteno e a  $\beta$ -criptoxantina não foram detetados em nenhuma das matrizes alimentares. Da mesma forma foi possível verificar que na amostra de quiche de cogumelo e milho não foram detetados os carotenoides em estudo no trabalho, apesar destes produtos conterem alguns ingredientes fonte de carotenoides como o ovo e o milho.

Por último os resultados obtidos para as amostras de sopa pertencentes ao grupo 5 apresentam-se na Tabela 5.14 assim como as suas recuperações. De forma similar também neste caso se elaborou um gráfico de barras (Figura 5.4) em que é possível visualizar de forma mais fácil as diferenças entre os resultados.

**Tabela 5.14.** Teor de carotenoides nas amostras do grupo 5 – Pratos de sopa e respetivas recuperações

Amostras		Teor de Carotenoides (mg/100 g)						Recuperação (%)
		$\alpha$ -caroteno	$\beta$ -caroteno	$\beta$ -criptoxantina	Licopeno	Luteína	Zeaxantina	
Sopa de tomate	SS	ND	0,049	ND	0,16	0,021	0,020	85
	S	ND	0,056	ND	0,20	0,026	0,025	70
Sopa de couve e feijão <sup>a</sup>	SS	0,45	0,70	ND	ND	0,16	ND	85
	S	0,48	0,76	ND	ND	0,17	ND	70
Caldo verde	SS	ND	0,053	ND	ND	0,077	ND	85
	S	ND	0,056	ND	ND	0,088	ND	70
Sopa de Agrião <sup>b</sup>	SS	0,24	0,54	ND	ND	0,18	ND	102
	S	0,30	0,59	ND	ND	0,22	ND	85
Canja de galinha	SS	0,022	0,046	ND	ND	0,035	0,0094	85
	S	0,027	0,051	ND	ND	0,026	0,011	70
Creme de Camarão <sup>c</sup>	SS	ND	0,16	ND	0,029	0,049	0,0096	85
	S	ND	0,21	ND	0,035	0,024	0,011	70

SS – Sem saponificação; S – Saponificação; ND – Não Detetado (limite de deteção < 0,0009 mg/100 g)

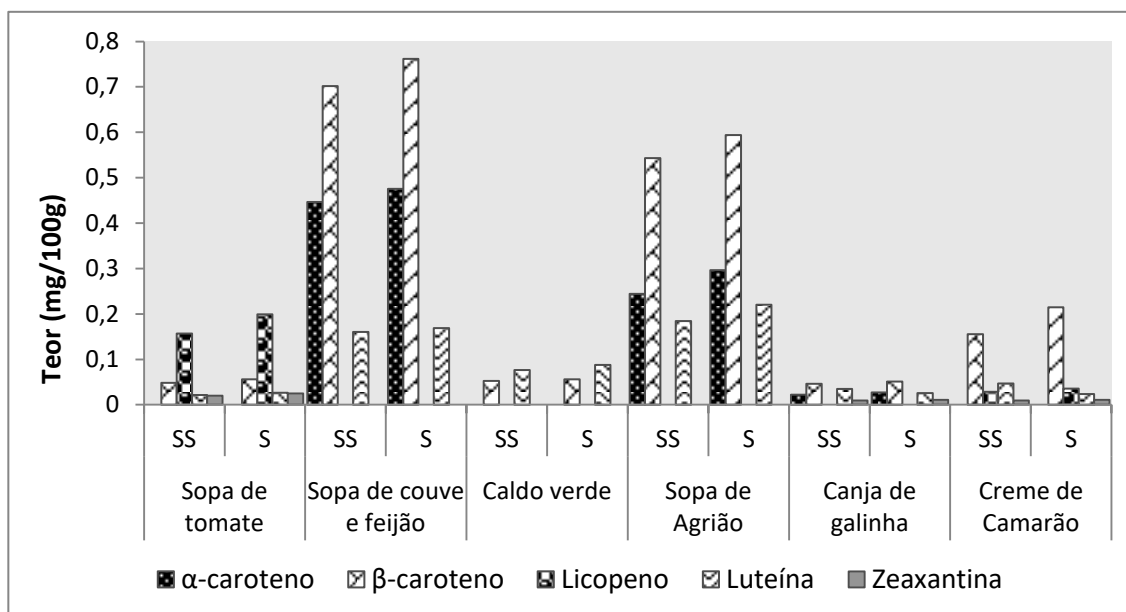
<sup>a</sup> Sopa de couve e feijão, ervilhas, feijão, grão com espinafres;

<sup>b</sup> Sopa de agrião, de cenouras, de espinafres, de feijão-verde;

<sup>c</sup> Creme de camarão, de marisco, sopa de peixe.

Com os dados obtidos, verificou-se que  $\beta$ -caroteno e luteína foram detetados e quantificados em todas as amostras. O  $\alpha$ -caroteno foi encontrado na sopa de couve e feijão, sopa de agrião e canja de galinha; o licopeno em amostras de sopa de tomate e creme de camarão e, a zeaxantina nas amostras de sopa de tomate, canja de galinha e creme de camarão. Por outro lado, a  $\beta$ -criptoxantina não foi detetada em nenhuma das amostras analisadas.

Das sopas analisadas as que mais contribuem para a ingestão de carotenoides são a sopa de couve com feijão, a sopa de tomate e a sopa de agrião.



**Figura 5.4.** Teor de carotenoides presentes em amostras do grupo 5 – Pratos de sopa (SS – Sem saponificação; S – Saponificação)

Do **grupo 7 – peixe, produtos da pesca, anfíbios, répteis e invertebrados** foram analisadas 4 matrizes alimentares, sendo elas os douradinhos, atum e sardinha em conserva e o mexilhão. Como se tratavam de amostras que continham gordura, foi realizado além do processo de extração o processo de saponificação. No entanto, para duas (atum em conserva e mexilhão) das quatro amostras o processo de saponificação do método implementado no laboratório não foi suficiente para eliminar a gordura existente nas amostras. Desse modo, foi necessário realizar o passo de saponificação prolongada (SP) em paralelo com o processo de saponificação implementado no laboratório (S).

De seguida na Tabela 5.15 apresentam-se os resultados obtidos para cada uma das amostras em análise e suas recuperações.

**Tabela 5.15.** Teor de carotenoides nas amostras do grupo 7

Amostra		Teor de Carotenoides (mg/100 g)						Recuperação (%)
		$\alpha$ -caroteno	$\beta$ -caroteno	$\beta$ -criptoxantina	Licopeno	Luteína	Zeaxantina	
Douradinhos	SS	ND	ND	ND	ND	0,0047	ND	58
	S	ND	ND	ND	ND	ND	ND	57
Atum conserva	SS	ND	ND	ND	ND	ND	ND	59
	S	ND	ND	ND	ND	ND	ND	27
	SP	ND	ND	ND	ND	ND	ND	25
Sardinha conserva	SS	ND	ND	ND	ND	ND	ND	72
	S	ND	ND	ND	ND	ND	ND	62
Mexilhão	SS	ND	ND	ND	ND	ND	ND	85
	S	ND	ND	ND	ND	ND	ND	70
	SP	ND	ND	ND	ND	ND	ND	70

**SS** – Sem saponificação; **S** – Saponificação; **SP** – Saponificação prolongada; **ND** – Não Detetado  
(limite de deteção < 0,0009 mg/100 g)

Com os resultados obtidos, foi possível concluir que apenas na amostra de douradinhos foram detetados teores de um dos seis carotenoides em estudo, sendo este a luteína (fonte provável – ovo). Nas restantes amostras analisadas não foram detetados qualquer dos carotenoides estudados.

As matrizes alimentares analisadas pertencentes ao **grupo 11 – cereais e produtos à base de cereais** foram produtos de pastelaria (ex. bolos de chocolate) e padaria (ex. broa de milho). Após a realização do processo sem saponificação verificou-se que quatro (bolo de chocolate, bolos de laranja, croissants e bolos de bolacha) das amostras apresentavam um teor de gordura que a saponificação do método implementado no laboratório não conseguia eliminar. Desse modo, realizou-se o processo de saponificação prolongada (SP) em paralelo com a saponificação do método implementado (S). Para as restantes amostras utilizou-se o processo de saponificação do método implementado (S).

Na tabela 5.16 estão identificadas as amostras e os respetivos teores de carotenoides presentes em cada uma delas, assim como as respetivas recuperações obtidas para cada amostra.

**Tabela 5.16.** Teor de carotenoides nas amostras do grupo 11

Amostras		Teor de Carotenoides (mg/100 g)						Recuperação (%)
		$\alpha$ -caroteno	$\beta$ -caroteno	$\beta$ -criptoxantina	Licopeno	Luteína	Zeaxantina	
Broa de milho	SS	ND	ND	ND	ND	0,086	ND	79
	S	ND	ND	ND	ND	0,15	ND	78
Bolachas de água e sal	SS	ND	ND	ND	ND	ND	ND	85
	S	ND	ND	ND	ND	ND	ND	70
Biscoitos e bolachas	SS	ND	ND	ND	ND	ND	ND	85
	S	ND	ND	ND	ND	ND	ND	70
Bolachas de chocolate	SS	ND	ND	ND	ND	ND	ND	85
	S	ND	ND	ND	ND	ND	ND	70
Bolos de bolacha <sup>a</sup>	SS	0,046	0,14	ND	ND	0,13	ND	62
	S	0,047	0,14	ND	ND	0,14	ND	30
	SP	0,049	0,15	ND	ND	0,11	ND	31
Bolo de chocolate	SS	ND	ND	ND	ND	0,072	0,082	45
	S	ND	ND	ND	ND	0,079	0,075	22
	SP	ND	ND	ND	ND	0,064	0,056	21
Bolos de laranja <sup>b</sup>	SS	ND	ND	ND	ND	0,12	0	52
	S	ND	ND	ND	ND	0,12	0,10	27
	SP	ND	ND	ND	ND	0,083	0,063	28
Bolo, queques	SS	ND	0,056	ND	ND	0,091	ND	43
	S	ND	0,061	ND	ND	0,052	ND	47
Bolos lêvados	SS	ND	ND	ND	ND	0,042	ND	72
	S	ND	ND	ND	ND	0,017	ND	64
Pão de leite	SS	ND	0,10	ND	ND	0,055	ND	85
	S	ND	0,10	ND	ND	0,035	ND	70
Croissants	SS	ND	0,045	ND	ND	0,076	ND	51
	S	ND	0,058	ND	ND	0,077	ND	27
	SP	ND	0,063	ND	ND	0,064	ND	24
Tartes de leite condensado <sup>c</sup>	S	ND	0,046	ND	ND	0,077	0,060	52
	S	ND	0,046	ND	ND	0,042	0,038	52
Bolo, bolo de arroz	SS	ND	0,059	ND	ND	0,085	0,049	52
	S	ND	0,069	ND	ND	0,049	0,033	53

SS – Sem saponificação; S – Saponificação; SP – Saponificação prolongada; ND – Não Detetado

(limite de deteção < 0,0009 mg/100 g)

<sup>a</sup> Bolos de bolacha, caramelo, cenoura, mel, amêndoa, canela;

<sup>b</sup> Bolos de laranja, maçã, inglês, ananás, coco, noz;

<sup>c</sup> Tartes de leite condensado, natas, leite condensado e chocolate.

Pela análise dos resultados obtidos, foi possível verificar que os carotenoides que se encontravam na maioria das amostras analisadas, foram o  $\beta$ -caroteno e a luteína. O  $\alpha$ -caroteno foi quantificado na amostra

de bolo de bolacha e a zeaxantina em amostras de bolo de chocolate, bolo de laranja e tartes de leite condensado. Por outro lado, a  $\beta$ -criptoxantina e o licopeno não foram detetados em nenhuma das amostras analisadas.

Do **grupo 12 – leguminosas, frutos secos, sementes oleaginosas e especiarias** apenas foi analisada a azeitona. Como se tratava de uma amostra com gordura foi realizada além da extração, a sua saponificação. No entanto, verificou-se que a amostra ainda apresentava gordura, pelo que foi efetuada uma saponificação prolongada (SP) em paralelo com o processo de saponificação do método implementado (S). Os resultados obtidos para esta amostra e respetivas recuperações apresentam-se na Tabela 5.17.

**Tabela 5.17.** Teor de carotenoides nas amostras do grupo 12 e respetivas recuperações

Amostra		Teor de Carotenoides (mg/100 g)						Recuperação (%)
		$\alpha$ -caroteno	$\beta$ -caroteno	$\beta$ -criptoxantina	Licopeno	Luteína	Zeaxantina	
Azeitona	SS	ND	ND	ND	ND	0,44	ND	80
	S	ND	0,045	ND	ND	0,42	0,089	34
	SP	ND	0,046	ND	ND	0,45	ND	34

**SS** – Sem saponificação; **S** – Saponificação; **SP** – Saponificação prolongada; **ND** – Não Detetado (limite de deteção < 0,0009 mg/100 g)

Neste tipo de amostra apenas foi possível quantificar  $\beta$ -caroteno, luteína e zeaxantina, sendo que o teor de luteína foi o mais elevado. O  $\alpha$ -caroteno, a  $\beta$ -criptoxantina e o licopeno não foram detetados na amostra de azeitona.

As matrizes alimentares analisadas pertencentes ao **grupo 13 - carne e produtos cárneos** foram produtos de carne, como o borrego e o chouriço. Como se tratava de amostras com gordura foi realizada além

da extração a sua saponificação. Como a amostra de borrego ainda apresentava gordura, procedeu-se a uma saponificação prolongada (SP) em paralelo com o processo de saponificação do método.

Na tabela 5.18 estão identificadas as amostras e os respetivos teores de carotenoides presentes em cada uma delas, assim como as respetivas recuperações obtidas nos diferentes processos a que a amostra foi sujeita na sua análise.

**Tabela 5.18.** Teor de carotenoides nas amostras do grupo 13 e respetivas recuperações

Amostras		Teor de Carotenoides (mg/100 g)						Recuperação (%)
		$\alpha$ -caroteno	$\beta$ -caroteno	$\beta$ -criptoxantina	Licopeno	Luteína	Zeaxantina	
Vitela, bife, costeleta	SS	ND	ND	ND	ND	ND	ND	79
	S	ND	ND	ND	ND	ND	ND	141
Presunto e bacon	SS	ND	ND	ND	ND	ND	ND	56
	S	ND	ND	ND	ND	ND	ND	56
Chouriço <sup>a</sup>	SS	ND	0,018	ND	ND	0,0030	ND	27
	S	ND	0,040	0,036	ND	ND	0,024	24
Borrego	SS	ND	ND	ND	ND	0,018	ND	58
	S	ND	ND	ND	ND	0,023	ND	30
	SP	ND	ND	ND	ND	0,024	ND	30

SS – Sem saponificação; S – Saponificação; SP – Saponificação prolongada; ND – Não Detetado  
(limite de deteção < 0,0009 mg/100 g)

<sup>a</sup> Chouriço, alheira, paio, chourição.

Após análise das amostras concluiu-se que foi possível detetar a luteína na maioria das amostras. Quanto ao  $\beta$ -caroteno,  $\beta$ -criptoxantina e zeaxantina apenas foram detetados e quantificados na amostra de chouriço. Por outro lado, verificou-se que o  $\alpha$ -caroteno e o licopeno não foram detetados em nenhuma das amostras em análise. Além disso, também se verificou que nas amostras de vitela, bife, costeleta e presunto e bacon não foram detetados nenhum dos seis tipos de carotenoides em estudo.



Do **grupo 14 – leite e produtos lácteos** foram analisadas apenas duas matrizes alimentares sendo elas o leite creme e o leite com cereais. Como se tratavam de amostras com gordura foi realizada além da extração a saponificação do método implementado no laboratório (S) que se mostraram eficientes.

De seguida na Tabela 5.19 apresentam-se os teores de carotenoides obtidos para cada uma das amostras em causa, assim como os valores das recuperações.

**Tabela 5.19.** Teor de carotenoides nas amostras do grupo 14 e respetivas recuperações

Amostras		Teor de Carotenoides (mg/100 g)						Recuperação (%)
		$\alpha$ -caroteno	$\beta$ -caroteno	$\beta$ -criptoxantina	Licopeno	Luteína	Zeaxantina	
Leite <sup>a</sup>	SS	ND	ND	ND	ND	ND	ND	66
	S	ND	ND	ND	ND	ND	ND	68
Leite creme <sup>b</sup>	SS	ND	ND	ND	ND	0,097	0,085	71
	S	ND	ND	ND	ND	0,074	0,028	74

**SS** – Sem saponificação; **S** – Saponificação; **ND** – Não Detetado (limite de deteção < 0,0009 mg/100 g)

<sup>a</sup> Leite com cereais, leite com chocolate;

<sup>b</sup> Leite creme e pudim flan.

Pelos resultados obtidos na análise das amostras, luteína e zeaxantina foram os únicos carotenoides detetados no leite creme e pudim flan. Quanto ao leite com cereais não se detetaram os carotenoides em avaliação neste trabalho.

De modo similar ao grupo 14 também no **grupo 15 – produtos alternativos, substitutos, suplementos, fortificantes** foram analisadas apenas duas matrizes alimentares, a soja à bolonhesa e a bebida de soja. Como se tratavam de amostras com gordura procedeu-se à realização do processo de saponificação, sendo que para a amostra de soja à bolonhesa o processo de saponificação do método implementado

no laboratório não foi capaz de eliminar a gordura existente na amostra e, por isso, utilizou-se o processo de saponificação prolongada (SP) em paralelo com o processo de saponificação do método implementado (S).

Na tabela 5.20 estão identificadas as amostras e os respetivos teores de carotenoides presentes em cada uma delas, assim como as respetivas recuperações obtidas nos diferentes processos a que se sujeitou a amostra.

**Tabela 5.20.** Teor de carotenoides nas amostras do grupo 15 e respetivas recuperações

Amostras		Teor de Carotenoides (mg/100 g)						Recuperação (%)
		$\alpha$ -caroteno	$\beta$ -caroteno	$\beta$ -criptoxantina	Licopeno	Luteína	Zeaxantina	
Soja à bolonhesa <sup>a</sup>	SS	ND	ND	ND	1,8	ND	ND	80
	S	ND	ND	ND	1,8	ND	ND	37
	SP	ND	ND	ND	0,95	ND	ND	35
Bebida de soja <sup>b</sup>	SS	ND	ND	ND	ND	0,016	ND	83
	S	ND	ND	ND	ND	0,019	ND	79

**SS** – Sem saponificação; **S** – Saponificação; **SP** – Saponificação prolongada; **ND** – Não Detetado (limite de deteção < 0,0009 mg/100 g)

<sup>a</sup> Soja à bolonhesa, hambúrguer de soja;

<sup>b</sup> Bebida de soja e baunilha, leite de soja.

Com a análise da amostra de soja à bolonhesa foi possível verificar que o único carotenoide presente foi o licopeno (provavelmente proveniente do tomate utilizado na sua preparação). Na bebida de soja apenas se detetou e quantificou a luteína. Por outro lado, os restantes carotenoides não foram detetados em qualquer amostra pertencente a este grupo.

Do **grupo 16 – temperos, molhos e condimentos** foram analisadas amostras de caldo de galinha, ketchup, maionese e molhos diversos. Como se tratavam de amostras com gordura, foi necessário realizar a sua saponificação além da habitual extração. No entanto, no

caso da amostra de maionese esta após a extração apresentava elevado teor de gordura, sendo necessário a realização da saponificação prolongada em paralelo com o processo de saponificação do método implementado no laboratório (S). Apenas as amostras de maionese saponificadas foram injetadas no sistema de HPLC, uma vez que o teor de gordura era bastante elevado e poderia danificar a coluna de HPLC.

De seguida, na tabela 5.21, são apresentados os teores de carotenoides obtidos para cada uma das amostras em causa e as respetivas recuperações.

**Tabela 5.21.** Teor de carotenoides nas amostras do grupo 16 e respetivas recuperações

Amostras		Teor de Carotenoides (mg/100 g)						Recuperação (%)
		$\alpha$ -caroteno	$\beta$ -caroteno	$\beta$ -criptoxantina	Licopeno	Luteína	Zeaxantina	
Caldo de galinha <sup>a</sup>	SS	ND	ND	ND	ND	ND	ND	79
	S	ND	ND	ND	ND	ND	ND	72
Ketchup	SS	ND	0,17	ND	5,6	0,034	ND	109
	S	ND	0,18	ND	5,6	0,041	ND	92
Maionese	S	ND	ND	ND	ND	ND	ND	9
	SP	ND	ND	ND	ND	ND	ND	11
Molhos <sup>b</sup>	SS	ND	ND	ND	0,26	ND	ND	84
	S	ND	ND	ND	0,39	ND	0,091	81

**SS** – Sem saponificação; **S** – Saponificação; **SP** – Saponificação prolongada; **ND** – Não Detetado (limite de deteção < 0,0009 mg/100 g)

<sup>a</sup> Caldo de galinha, caldo de carne de vaca;

<sup>b</sup> Molhos cocktail, cubano, de alho, barbecue, inglês, de pimenta.

Após a análise das amostras, verificou-se que a amostra de ketchup continha  $\beta$ -caroteno, licopeno e luteína e a de molhos apresentava licopeno e zeaxantina. Os restantes carotenoides não foram detetados em nenhuma das amostras analisadas. Por outro lado, verificou-se que nas amostras de caldo de galinha e maionese não foi detetado qualquer dos seis carotenoides em estudo.

Para o **grupo 18 – açúcar, confeitaria e sobremesas doces à base de água** procedeu-se à análise de duas matrizes alimentares sendo elas a sobremesa de chocolate e a gelatina. Como a sobremesa de chocolate continha gordura, foi necessário realizar a sua saponificação além da extração. No entanto, esta amostra após a extração apresentou elevados teores de gordura, sendo necessário a realização da saponificação prolongada (SP) em paralelo com o processo de saponificação do método implementado no laboratório (S).

Na tabela 5.22 são apresentados os teores de carotenoides presentes em cada uma das amostras, assim como as suas recuperações.

**Tabela 5.22.** Teor de carotenoides nas amostras do grupo 18 e respetivas recuperações

Amostras		Teor de Carotenoides (mg/100 g)						Recuperação (%)
		$\alpha$ -caroteno	$\beta$ -caroteno	$\beta$ -criptoxantina	Licopeno	Luteína	Zeaxantina	
Sobremesa de chocolate	SS	ND	ND	ND	ND	ND	ND	85
	S	ND	ND	ND	ND	ND	ND	70
	SP	ND	ND	ND	ND	ND	ND	70
Gelatina	SS	ND	ND	ND	ND	ND	ND	85
	S	ND	ND	ND	ND	ND	ND	70
	SP	ND	ND	ND	ND	ND	ND	70

SS – Sem saponificação; S – Saponificação; SP – Saponificação prolongada; ND – Não Detetado (limite de deteção < 0,0009 mg/100 g)

Conforme se observa na tabela, verificou-se que nenhum dos seis carotenoides foi detetado nas amostras de sobremesa de chocolate e gelatina.

Do **grupo 19 – produtos hortícolas e derivados** foram analisados diversos tipos de produtos como matrizes alimentares. Como são amostras que não apresentam gordura e em que os carotenoides não estão na forma esterificada, só foi realizada a etapa de extração. De

seguida, são apresentados os teores de carotenoides presentes nas amostras em estudo e respetivas recuperações.

**Tabela 5.23.** Teor de carotenoides nas amostras do grupo 19 e respetivas recuperações

Amostras	Teor de Carotenoides (mg/100 g)						Recuperação (%)
	$\alpha$ -caroteno	$\beta$ -caroteno	$\beta$ -criptoxantina	Licopeno	Luteína	Zeaxantina	
Couve-de-Bruxelas	0,023	ND	ND	ND	0,40	ND	104
Couve-branca	ND	0,071	ND	ND	0,35	ND	117
Couve-portuguesa	ND	3,5	ND	ND	5,5	ND	88
Cebola	ND	ND	ND	ND	0,11	ND	119
Espargos	ND	0,095	ND	ND	0,22	ND	81
Melancia	ND	ND	ND	2,7	ND	ND	100
Milho	ND	0,0050	0,018	ND	0,65	0,48	77

ND – Não Detetado (limite de deteção < 0,0009 mg/100 g)

Pelos resultados obtidos foi possível concluir que os carotenoides presentes na maioria das amostras analisadas foram o  $\beta$ -caroteno e a luteína. O  $\alpha$ -caroteno foi apenas encontrado na amostra de couve-de-Bruxelas, a  $\beta$ -criptoxantina e a zeaxantina na de milho e o licopeno na de melancia. Para este grupo de alimentos, a couve-portuguesa é uma fonte muito rica em carotenoides.

Uma vez que existem estudos publicados nesta área e para completar a análise dos resultados obtidos neste trabalho foi realizada uma comparação com resultados de outros autores (Tabela 5.24).

**Tabela 5.24.** Teores de carotenoides em frutos e produtos hortícolas (mg/100 g)

Amostras		Teor de Carotenoides (mg/100 g)					
		$\alpha$ -caroteno	$\beta$ -caroteno	$\beta$ -criptoxantina	Licopeno	Luteína	Zeaxantina
Couve-de-Bruxelas	Trabalho	0,023	ND	ND	ND	0,40	ND
	Khoo <i>et al.</i> (2011)	0,006	0,14-0,45	ND	ND	0,43	ND
	Saini <i>et al.</i> (2015)	ND	0,0718	1,163	ND	1,163	ND
Melancia	Trabalho	ND	ND	ND	2,7	ND	ND
	Khoo <i>et al.</i> (2011)	0-0,76	0,14-6,806	0,09-0,48	0,071-11,389	ND	ND
	Saini <i>et al.</i> (2015)	ND	ND	ND	0,7	17,2	ND
Milho	Trabalho	ND	0,0050	0,018	ND	0,65	0,48
	Saini <i>et al.</i> (2015)	ND	ND	0,17	ND	1,31	0,62
Espargos	Trabalho	ND	0,095	ND	ND	0,22	ND
	Khoo <i>et al.</i> (2011)	0,012	0,493	ND	ND	ND	ND

ND – Não Detetado (limite de deteção &lt; 0,0009 mg/100 g)

No que diz respeito à couve-de-Bruxelas e comparando com os valores obtidos por Khoo *et al.* verifica-se que são semelhantes em termos de luteína, no entanto o teor de  $\alpha$ -caroteno encontra-se acima do valor referido por esses autores. Por outro lado, não foi possível detetar  $\beta$ -caroteno como referido por Khoo *et al.* Em comparação com os valores obtidos por Saini *et al.* verifica-se que o teor de luteína obtido se encontra abaixo do valor publicado, sendo que o  $\alpha$ -caroteno não foi detetado por Saini *et al.* No entanto referem a presença de  $\beta$ -criptoxantina não detetada neste trabalho. Estas conclusões devem-se ao facto de esta amostra ter sido recolhida e analisada no Brasil, cujo clima tropical tem mais horas de sol do que Portugal (aproximadamente 8 horas).

No caso da melancia e para o licopeno verifica-se que o valor obtido está dentro do intervalo obtido por Khoo *et al.* Estes autores referem no seu trabalho, para além do teor de licopeno, teores de  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno e  $\beta$ -criptoxantina não detetados no presente trabalho. Estas variações devem-se ao facto de esta amostra ter sido recolhida e analisada na Indonésia, uma vez que este país apresenta

uma média de horas de sol diárias de 13 h. Em comparação com os valores obtidos por Saini *et al.* verifica-se que o valor obtido neste trabalho para o licopeno é superior ao publicado por esses autores. Saini *et al.* apenas referem teores de licopeno e luteína na melancia.

Para a amostra de milho fez-se a comparação com os autores Saini *et al.* e verificou-se que o teor de zeaxantina é semelhante ao valor obtido pelo autor. Os teores de  $\beta$ -criptoxantina e luteína encontram-se abaixo do referido. Por outro lado, Saini *et al.* não detetaram  $\beta$ -caroteno quando realizaram o trabalho.

No que diz respeito à amostra de espargos, verificou-se que em comparação com os valores obtidos por Khoo *et al.* para o  $\beta$ -caroteno os resultados no presente trabalho encontram-se abaixo dos valores referidos pelos autores. Por outro lado, no presente trabalho detetou-se luteína mas não foi possível comparar com os de Khoo *et al.*, uma vez que esses autores não detetaram este analito; no entanto referem a presença de  $\alpha$ -caroteno que não foi detetado neste trabalho.

#### **5.3.1.1. Efeito do processo da saponificação no teor de carotenoides e análise das taxas de recuperação**

A discussão de resultados obtidos nos diferentes processos para cada grupo de alimentos mencionado anteriormente foi realizada tendo por base o valor máximo da incerteza expandida relativa associada ao método validado (30%). Através deste valor de incerteza foi possível comparar os resultados obtidos para os diferentes processos a que as amostras foram sujeitas.

Desse modo e, para todas as amostras pertencentes a todos os grupos (com exceção do grupo 19) verificou-se que os teores de  $\alpha$ -caroteno (deriva da cenoura),  $\beta$ -caroteno e licopeno (deriva do tomate) são semelhantes com ou sem o processo de saponificação das amostras. Estes resultados eram de esperar uma vez que  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -

caroteno e licopeno são carotenoides que não estão esterificados nas amostras.

No que diz respeito aos teores de  $\beta$ -criptoxantina, luteína (proveniente do ovo) e zeaxantina apresentam semelhanças, com ou sem o processo de saponificação, na maioria das amostras analisadas. Isso permite evidenciar que o processo de saponificação apenas removeu a gordura existente nas amostras e que estes carotenoides não se encontravam na sua forma esterificada.

No caso da luteína verificou-se que nas amostras de lasanha, bacalhau com natas, omelete, pizza, creme de camarão, pão de leite, douradinhos e tartes de leite condensado os teores são inferiores quando se procede à saponificação com o método implementado no laboratório; este facto poderá estar relacionado com os baixos teores de luteína nestes alimentos, próximos da zona do limite de quantificação em que a incerteza dos resultados é superior. Por outro lado, o processo de saponificação destrói parte dos carotenoides e para teores muito baixos a incerteza da recuperação do padrão interno afeta mais significativamente os resultados.

No caso da zeaxantina existem duas vertentes a considerar, teores superiores ou inferiores quando se procede à saponificação. O primeiro caso ocorre na amostra de omelete e permite evidenciar que após a saponificação da amostra a zeaxantina sofreu desesterificação, uma vez, que o teor deste carotenoide é superior quando se procede à saponificação. O segundo caso ocorre nas amostras tartes de leite condensado e bolo de arroz e, assim como acontece na luteína, os teores obtidos são inferiores quando se realiza a saponificação; este facto pode estar relacionado com os baixos teores de zeaxantina para estes alimentos situados na proximidade do limite de quantificação em que a incerteza dos resultados é superior. Também o processo de saponificação pode destruir parte dos carotenoides e para teores muito baixos os resultados não são devidamente corrigidos pelo padrão interno como referido anteriormente para a luteína.



Para as amostras em que se procedeu à saponificação prolongada em paralelo com o processo de saponificação do método implementado no laboratório, observaram-se diferenças entre os processos de saponificação nas amostras de cozido à portuguesa, bolo de laranja, carne de borrego e bolo de chocolate.

Na amostra de cozido à portuguesa verificou-se que os teores de luteína em S e SP são diferentes, sendo que o valor em SP é superior ao obtido em S (Figura 5.2); isto permite evidenciar que no fim da primeira saponificação, a luteína ainda não estaria completamente desesterificada. No caso da amostra de bolo de laranja verificou-se que os teores de luteína e zeaxantina em SP são inferiores aos obtidos em S; evidenciando que na zona do limite de quantificação a incerteza dos resultados é superior ao valor obtido durante o processo de validação. O mesmo acontece com o teor de zeaxantina na amostra de bolo de chocolate.

Em relação à amostra de carne de borrego verificou-se que os teores de luteína são semelhantes entre o processo sem saponificação e o processo com saponificação (S). No entanto, em SP o teor de luteína é superior em relação aos teores sem e com saponificação. Esta diferença evidencia que o processo de saponificação SP além de eliminar a gordura existente procedeu à desesterificação da luteína.

Para a amostra de arroz de cabidela verificou-se que o teor de luteína apenas foi detetado quando se fez o passo de saponificação, o que significa que a luteína estava na forma esterificada e, por isso, não ocorreu a sua deteção sem o processo de saponificação.

Por último, na amostra de molhos verificou-se que o teor de zeaxantina na etapa sem saponificação não foi detetado, uma vez que o alimento apresenta um teor inferior ao limite de deteção do método analítico. O mesmo não acontece quando se realiza o passo de saponificação.

No caso das amostras a que se procedeu à saponificação a quente, verificou-se que a amostra de azeite apresenta teores de  $\beta$ -caroteno e

luteína iguais em SQ-1 e SQ-2; estes resultados seriam de esperar uma vez que se trata de duplicados da mesma amostra.

Para a amostra de manteiga verificou-se que o  $\beta$ -caroteno é carotenoide preponderante. Foi possível detetar também a luteína mas o valor determinado estava abaixo do limite de quantificação. Esta diferença está relacionada com o perfil de carotenoides no leite.

Os valores das taxas de recuperação do padrão interno variaram entre 9-121% quando o procedimento analítico não incluía a saponificação e 11-141% quando incluía esse passo. Em comparação com os valores de recuperação obtidos na validação do método analítico, os determinados no presente trabalho apresentam uma gama mais ampla que os anteriores, o que está relacionado com a diversidade de amostras analisadas durante este trabalho (ex. amostra com elevado teor de gordura). A amostra em que a recuperação do padrão interno apresenta um valor mais baixo tanto no processo sem saponificação assim como no processo com saponificação foi a maionese (9% para processo sem saponificação e 11% para processo com saponificação); isto verificou-se por se tratar de um tipo de amostra que apresentava um teor de gordura elevado e, que além de apresentar recuperações muito baixas também não foi possível detetar ou quantificar nenhum carotenoide em estudo.

Para algumas amostras as taxas de recuperação não se situaram dentro do intervalo obtido durante a validação, no entanto, isto aconteceu uma vez que as amostras são de natureza diferente das utilizadas na validação do método implementado.

### 5.3.2. Amostras sazonais

Um dos fatores que influenciam a composição dos produtos hortícolas em termos de carotenoides é a estação do ano em que são produzidos. Com o objetivo de avaliar o efeito da sazonalidade em produtos hortícolas (amostras do grupo 19) foram analisadas amostras destes produtos, recolhidas em duas estações do ano, outono e inverno. Os resultados obtidos apresentam-se na Tabela 5.25.

**Tabela 5.25.** Efeito da sazonalidade no teor de carotenoides em produtos hortícolas

Amostra		Teor de Carotenoides (mg/100 g)					
		$\alpha$ -caroteno	$\beta$ -caroteno	$\beta$ -criptoxantina	Licopeno	Luteína	Zeaxantina
Brócolos	3	ND	0,53	ND	ND	1,3	ND
	4	ND	0,50	ND	ND	1,0	ND
Couve-flor	3	ND	0,0026	ND	ND	0,010	ND
	4	ND	0,0033	ND	ND	0,0060	ND
Tomate	3	ND	0,51	ND	3,3	0,87	ND
	4	ND	0,62	ND	3,6	0,89	ND
Pimento	3	ND	0,83	ND	ND	0,49	0,46
	4	ND	0,76	ND	ND	0,48	0,12
Alface	3	ND	2,0	ND	ND	2,3	ND
	4	ND	1,7	ND	ND	2,0	ND
Grelhos	3	ND	4,1	ND	ND	7,9	ND
	4	ND	4,9	ND	ND	8,2	ND
Nabiças	3	ND	5,1	ND	ND	9,0	ND
	4	ND	5,3	ND	ND	7,7	ND
Feijão-verde	3	ND	0,23	ND	ND	0,62	ND
	4	ND	0,16	ND	ND	0,58	ND
Cenoura	3	7,6	11	ND	ND	2,8	ND
	4	6,6	14	ND	ND	2,1	ND

3 – outono; 4 – inverno; ND – Não detetado (limite de deteção < 0,0009 mg/100g)

A partir dos resultados obtidos verificou-se que o  $\beta$ -caroteno e a luteína foram detetados em todas as amostras. No que diz respeito, ao  $\alpha$ -caroteno foi possível a sua quantificação apenas nas amostras de cenoura, o licopeno nas de tomate e a zeaxantina só nas amostras de pimento. Por outro lado, verificou-se que a  $\beta$ -criptoxantina não foi

detetada em nenhuma das amostras de produtos hortícolas. É de salientar que a amostra de nabijas foi a que apresentou maior teor de luteína (8,3 mg/100 g) e, a amostra de cenoura a que apresentou maior teor de  $\beta$ -caroteno (12 mg/100 g).

Pela análise dos resultados obtidos, verificou-se que o teor de  $\alpha$ -caroteno nas cenouras foi superior no outono, assim como acontece ao teor de zeaxantina no pimento. No caso do licopeno, o teor é semelhante nas duas estações do ano. Para o conjunto de produtos hortícolas analisados para o estudo da sazonalidade o teor de  $\beta$ -caroteno variou entre 0,0026 e 11 mg/100 g no outono e entre 0,0033 e 14 mg/100 g no inverno. No que diz respeito, ao teor de luteína este variou entre 0,010 e 7,9 mg/100 g no outono e entre 0,0060 e 8,2 mg/100 g no inverno. Para os alimentos deste grupo as maiores fontes de carotenoides são os grelos, as nabijas e a cenoura.

De forma a verificar se as amostras analisadas apresentam diferenças significativas no teor de carotenoides nas diferentes estações do ano, foi determinado o valor de diferença mínima significativa (LSD) de acordo com a equação (4.2); o que envolveu o cálculo da incerteza dos teores de cada carotenoide nas diferentes amostras (Anexo 5). Os resultados apresentam-se na Tabela 5.26.

**Tabela 5.26.** Diferença mínima significativa (LSD) nos teores de carotenoides nas amostras de produtos hortícolas sazonais

Amostras		Teor de Carotenoides (mg/100 g)					
		$\alpha$ -caroteno	$\beta$ -caroteno	$\beta$ -criptoxantina	Licopeno	Luteína	Zeaxantina
Brócolos	Diferença	ND	0,026	ND	ND	0,28	ND
	LSD		0,19			0,43	
Couve-flor	Diferença	ND	0,00070	ND	ND	0,0042	ND
	LSD		0,0012			0,0030	
Tomate	Diferença	ND	0,11	ND	0,3046	0,021	ND
	LSD		0,20		0,9083	0,33	
Pimento	Diferença	ND	0,074	ND	ND	0,0091	0,35
	LSD		0,29			0,18	0,14
Alface	Diferença	ND	0,38	ND	ND	0,29	ND
	LSD		0,67			0,80	
Grelos	Diferença	ND	0,77	ND	ND	0,30	ND
	LSD		1,6			3,0	
Nabiças	Diferença	ND	0,19	ND	ND	1,3	ND
	LSD		1,9			3,1	
Feijão-verde	Diferença	ND	0,076	ND	ND	0,038	ND
	LSD		0,070			0,22	
Cenoura	Diferença	0,95	3,0	ND	ND	0,66	ND
	LSD	2,3	4,6			0,90	

**LSD** – Least Significant Difference (diferença mínima significativa); **ND** – Não Detetado (limite de deteção < 0,0009 mg/100 g)

Através da comparação entre o valor de LSD e a diferença entre os teores de carotenoides em cada amostra, verificou-se que apenas em três casos a diferença de teores é superior ao valor de LSD o que permite concluir que nestes casos as diferenças são significativas. Os três casos a apontar são o  $\beta$ -caroteno no feijão-verde, a luteína na couve-flor e a zeaxantina no pimento.

Deste modo, foi possível concluir que apenas estes três carotenoides nestas amostras de produtos hortícolas, são afetados pela estação do ano em que são recolhidos esses produtos. O teor destes carotenoides nas amostras em questão é superior no outono. A ingestão

destes alimentos nessa época do ano, sob o ponto de vista dos carotenoides, é mais favorável do que no inverno.

Para completar a análise dos resultados obtidos foi realizada uma comparação entre os teores médios obtidos no presente trabalho (nas duas estações do ano, outono e inverno) e os resultados obtidos anteriormente por outros autores em trabalhos recentes. Estes valores são apresentados na Tabela 5.27.

**Tabela 5.27.** Teores de carotenoides em produtos hortícolas (mg/100 g)

Amostras		Teor de Carotenoides (mg/100 g)					
		$\alpha$ -caroteno	$\beta$ -caroteno	$\beta$ -criptoxantina	Licopeno	Luteína	Zeaxantina
Brócolos	Trabalho	ND	0,51	ND	ND	1,2	ND
	Khoo <i>et al.</i> (2011)	0,001	0,779-0,898	ND	ND	0,68-1,28	ND
	Saini <i>et al.</i> (2015)	ND	1,138	0,015	ND	2,805	ND
Alface	Trabalho	ND	1,9	ND	ND	2,2	ND
	Khoo <i>et al.</i> (2011)	ND	0,097-1,4	ND	0,073	ND	ND
	Saini <i>et al.</i> (2015)	ND	1,49	ND	1,35	ND	ND
Pimento	Trabalho	ND	0,80	ND	ND	0,49	0,29
	Khoo <i>et al.</i> (2011)	0,022-0,059	0,2-2,38	2,21	ND	0,22	ND
Tomate	Trabalho	ND	0,56	ND	3,4	0,88	ND
	Khoo <i>et al.</i> (2011)	2,5	0,365-1,3	ND	0,009-2,0	0,13-0,289	0,014
Cenoura	Trabalho	7,1	12	ND	ND	2,4	ND
	Khoo <i>et al.</i> (2011)	3,41-6,2	6,5-21	ND	ND	ND	ND
	Saini <i>et al.</i> (2015)	4,5	5,36	ND	ND	0,15	ND
Nabiças	Trabalho	ND	5,2	ND	ND	8,3	ND
	Dias <i>et al.</i> (2012)	ND	4,4	ND	ND	5,6	ND
Couve-flor	Trabalho	ND	0,0030	ND	ND	0,0081	ND
	Khoo <i>et al.</i> (2011)	ND	0,08-6,5	ND	ND	0,05-0,13	ND
	Saini <i>et al.</i> (2015)	ND	0,022	0,015	ND	0,028	ND
Feijão-verde	Trabalho	ND	0,20	ND	ND	0,60	ND
	Khoo <i>et al.</i> (2011)	0,28	0,8	ND	ND	ND	ND

ND – Não detetado (limite de deteção < 0,0009 mg/100 g)

No que diz respeito à amostra de brócolos e em comparação com Khoo *et al.* verifica-se que o teor de luteína determinado neste trabalho

se encontra no intervalo de valores referido por esses autores; mas o de  $\beta$ -caroteno é nitidamente inferior. Estas conclusões podem estar relacionadas por exemplo com o clima do local de produção; esta amostra foi recolhida e analisada em Espanha e, uma vez que este país apresenta um número médio de horas de sol de 12 h, isto é, superior ao número de Portugal (aproximadamente 8 horas), a carotenogénese pode eventualmente ter sido favorecida. Comparando com Saini *et al.* os teores publicados por estes autores para os mesmos carotenoides são mais elevados do que os determinados por Khoo *et al.* e neste trabalho.

Para a amostra de alface, verificou-se após a comparação com os trabalhos de Khoo *et al.* e Saini *et al.*, que os teores de  $\beta$ -caroteno e luteína são superiores aos referidos por esses autores. Os valores publicados por Khoo *et al.* referem-se a uma amostra recolhida e analisada na Malásia, um país apresenta uma média de 10 h de sol diárias; por outro lado a produção de carotenoides para uma mesma espécie pode variar bastante de variedade para variedade. Enquanto a amostra portuguesa era composta pelas variedades mais consumidas em Portugal sobre a amostra da Malásia não há indicação. Este facto evidencia a necessidade de caracterização das amostras ao nível pelo menos da variedade quando se publicam dados sobre composição em carotenoides.

Quanto à amostra de pimento Khoo *et al.* referem a presença de  $\alpha$ -caroteno e  $\beta$ -criptoxantina que não foram detetados no presente trabalho. O intervalo de valores referido por estes autores para o teor de  $\beta$ -caroteno incluiu o resultado obtido neste trabalho; no entanto para a luteína o seu teor é inferior ao obtido no presente trabalho.

No que diz respeito à amostra de tomate e em comparação com os valores obtidos por Khoo *et al.* verifica-se que o teor de  $\beta$ -caroteno se encontra dentro do intervalo referido por esses autores, no entanto, os teores de licopeno e luteína encontram-se acima dos referidos no trabalho desenvolvido por Khoo *et al.*. No presente trabalho não foi detetado  $\alpha$ -caroteno ao contrário do que foi reportado por Khoo *et al.*.

No caso da cenoura, verificou-se que o teor de  $\beta$ -caroteno se encontra dentro do intervalo obtido por Khoo *et al.*; mas o teor de  $\alpha$ -caroteno é superior ao reportado por esses autores. Em comparação com Saini *et al.* os resultados obtidos são superiores aos referidos por esses autores. Khoo *et al.* recolheu e analisou a amostra proveniente do Japão, apresentando uma média de 10 h de sol diárias, sendo este superior ao número de horas de sol diárias em Portugal (~ 8 horas); sobre a variedade não há indicação.

Os resultados determinados para as nabijas foram comparados com os reportados por Dias *et al.*. Em ambos os trabalhos não se detetaram  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -criptoxantina, licopeno e zeaxantina. Para os outros carotenoides, os teores encontrados são superiores aos obtidos por Dias *et al.*. Ambos os trabalhos utilizam amostras provenientes de Portugal, no entanto, estas diferenças podem estar relacionadas com as condições em que foram cultivadas tais como solo/clima/estufa/ar livre.

No que diz respeito à amostra de couve-flor e em comparação com os autores Khoo *et al.* e Saini *et al.* verificou-se que os resultados obtidos encontram-se abaixo dos referidos pelos dois autores em questão. Estas conclusões devem-se ao facto de esta amostra ter sido recolhida e analisada no Brasil, um país que apresenta um clima tropical diferente do Português.

No caso da amostra de feijão-verde e em comparação com o autor Khoo *et al.* verifica-se que os resultados obtidos no presente trabalho se encontram abaixo dos obtidos pelo referido autor.



## 5.4. Equivalentes de Retinol

Os equivalentes de retinol (RE) expressam a atividade dos carotenoides como vitamina A (retinol) sendo que os carotenoides com atividade pró-vitamina A são o  $\alpha$ -caroteno, o  $\beta$ -caroteno e a  $\beta$ -criptoxantina. Desse modo, selecionaram-se as amostras que apresentavam estes carotenoides na sua constituição. Para essas amostras e tendo em conta a equação (4.4) referida no ponto 4.12 foi possível determinar o valor de RE para cada amostra, sendo os resultados apresentados na Tabela 5.28.

Como a maioria das amostras foram sujeitas a um processo de saponificação, os valores utilizados na determinação do RE dizem respeito aos valores mais elevados entre os processos com e sem saponificação para cada amostra. No caso das amostras sazonais foram calculados os teores médios obtidos no presente trabalho e, posteriormente foram determinados os respetivos valores de RE.

**Tabela 5.28.** Equivalentes de retinol para as amostras

Amostras	Teor de carotenoides (mg/100g)			RE (µg/100g)
	α-caroteno	β-caroteno	β-criptoxantina	
Azeite	ND	0,11	ND	18
Manteiga com sal	ND	0,31	ND	52
Dobrada	0,029	0,059	ND	12
Cozido à portuguesa	0,018	0,045	ND	9,0
Feijoada	0,049	0,12	ND	24
Carne à bolonhesa	0,026	0,082	ND	16
Arroz de gambas	ND	0,051	ND	8,6
Arroz de bacalhau	ND	0,051	ND	8,5
Pizza	ND	0,048	ND	7,9
Lasanha	ND	0,084	ND	14
Arroz à valenciana	0,21	0,47	ND	96
Arroz de cenoura	ND	0,087	ND	15
Sopa de tomate	ND	0,056	ND	9
Sopa de couve e feijão	0,48	0,76	ND	167
Caldo verde	ND	0,056	ND	9,3
Sopa de agrião	0,30	0,59	ND	124
Canja de galinha	0,027	0,051	ND	11
Creme de camarão	ND	0,21	ND	36
Bolos de bolacha	0,049	0,15	ND	28
Bolo, queques	ND	0,061	ND	10
Pão de leite	ND	0,10	ND	17
Croissants	ND	0,063	ND	11
Tartes de leite condensado	ND	0,046	ND	7,7
Bolo, Bolo de arroz	ND	0,069	ND	11
Azeitona	ND	0,046	ND	7,7
Chouriço	ND	0,040	0,036	9,7
ketchup	ND	0,18	ND	30
Couve de Bruxelas	0,023	ND	ND	1,9
Couve branca	ND	0,071	ND	12
Couve portuguesa	ND	3,5	ND	578
Espargos	ND	0,095	ND	16
Milho	ND	0,0050	0,018	2,3
Sushi	ND	0,058	0,011	11
Brócolos	ND	0,51	ND	86
Couve-flor	ND	0,003	ND	0,50
Tomate	ND	0,56	ND	93
Pimento	ND	0,80	ND	133
Alface	ND	1,9	ND	311
Grelos	ND	4,5	ND	753
Nabiças	ND	5,2	ND	869
Feijão-verde	ND	0,20	ND	33
Cenoura	7,1	13	ND	2710

ND – Não detetado (limite de deteção < 0,0009 mg/100 g)

Através destes resultados foi possível concluir que algumas amostras apresentaram elevada atividade como vitamina A. No que diz respeito às amostras não sazonais, são de referir como exemplo as amostras de arroz à valenciana (RE = 96  $\mu\text{g}/100\text{ g}$ ), sopa de agrião (RE = 124  $\mu\text{g}/100\text{ g}$ ), sopa de couve e feijão (RE = 167  $\mu\text{g}/100\text{ g}$ ) e couve-portuguesa (RE = 578  $\mu\text{g}/100\text{ g}$ ).

Para as amostras sazonais verificou-se que a amostra com um valor maior para o RE foi a de cenoura (RE = 2710  $\mu\text{g}/100\text{ g}$ ), proveniente do  $\alpha$ -caroteno e do  $\beta$ -caroteno. As amostras que apenas apresentaram como carotenoides pró-vitamina A  $\beta$ -caroteno têm ainda assim valores elevados de RE num intervalo de 133  $\mu\text{g}/100\text{ g}$  (pimento) a 869  $\mu\text{g}/100\text{ g}$  (nabiças). Na realidade o  $\beta$ -caroteno é o maior contributor para a atividade dos carotenoides como vitamina A.

Por outro lado, existem amostras de produtos hortícolas em que o valor de RE é muito baixo como 0,5  $\mu\text{g}/100\text{ g}$  para a couve-flor, 1,9  $\mu\text{g}/100\text{ g}$  para a couve-de-Bruxelas e 2,3  $\mu\text{g}/100\text{ g}$  para o milho.

As restantes amostras potencialmente com pró-vitamina A apresentam valores de RE num intervalo entre 7,7  $\mu\text{g}/100\text{ g}$  (azeitona) e 52  $\mu\text{g}/100\text{ g}$  (manteiga com sal).



## 6. Conclusões

A realização deste trabalho permitiu retirar algumas conclusões que se apresentam seguidamente.

No que diz respeito à avaliação do desempenho do método analítico utilizado na análise das diversas amostras foi possível concluir que tanto o material de referência certificado NIST 2383, como o material de referência interno preparado no laboratório do INSA apresentam resultados concordantes com os respetivos valores de referência. Essa conclusão foi obtida através do cálculo do *z-score* que apresentou os valores de 0 a 1,6 para o material de referência certificado NIST 2383 e, 0,2 a 2,1 para o material de referência interno realizado no INSA. Desse modo, pode-se afirmar que o método analítico utilizado é um método exato.

A homogeneidade das amostras foi determinada através da análise de variâncias (ANOVA) aplicando o teste de Cochran. Pelos resultados obtidos no teste ao usar uma matriz difícil como o tomate foi possível concluir que o processo de homogeneização foi adequado para a determinação de carotenoides em alimentos, segundo um método de HPLC e amostras de massa superior a 1 g.

As amostras de alimentos do grupo dos produtos hortícolas e derivados não necessitaram do passo de saponificação porque o teor de gordura é muito baixo e os carotenoides não se apresentam na forma esterificada. As amostras com teor de gordura superior a 10% e inferior a 80% necessitam de um processo de saponificação prolongado (de pelo menos 18 h) e as com um teor de gordura superior a 80% necessitam de um processo de saponificação a quente.

Os carotenoides que se encontraram na maioria das amostras analisadas foram o  $\beta$ -caroteno (0,018-14 mg/100 g) e a luteína (0,0014-8,2 mg/100 g). Menos predominantes nas amostras foram o  $\alpha$ -caroteno (0,014-7,6 mg/100 g), a  $\beta$ -criptoxantina (0,010-0,036 mg/100 g), o licopeno (0,0043-5,61 mg/100 g) e a zeaxantina (0,0096-0,46 mg/100 g).

Para o caso das amostras sazonais foram analisadas duas estações diferentes, outono e inverno. Desse modo e, através da determinação da diferença mínima significativa foi possível verificar que os resultados obtidos para cada uma das amostras nas diferentes estações não apresentavam diferenças significativas, com exceção das amostras de feijão-verde ( $\beta$ -caroteno), couve-flor (luteína) e pimento (zeaxantina).

Em relação à comparação com dados da literatura verificou-se que a maioria dos resultados obtidos no presente trabalho apresenta discrepâncias em relação aos valores obtidos por *Saini et al.*, *Khoo et al.* e *Dias et al.*; salvo pequenas exceções como a luteína na amostra de couve-de-Bruxelas que apresenta um teor semelhante ao obtido por *Khoo et al.*. Este facto reforça a necessidade de obtenção de dados analíticos de carotenoides para as diferentes variedades e/ou receitas dos alimentos consumidos em diferentes países, pois só assim será possível avaliar a ingestão de carotenoides por determinada população.

Os teores mais elevados de cada carotenoide nas amostras analisadas no âmbito deste trabalho foram:  $\alpha$ -caroteno na cenoura (7,1 mg/100 g),  $\beta$ -caroteno na cenoura (12 mg/100 g),  $\beta$ -criptoxantina no sushi (0,011 mg/100 g), licopeno no ketchup (5,6 mg/100 g), luteína nas nabiças (8,3 mg/100 g) e zeaxantina no milho (0,48 mg/100 g).

As taxas de recuperação do padrão interno variaram entre 9-121% para o processo sem saponificação e 11-141% para o processo com saponificação. Comparando com os valores obtidos durante a validação do método analítico concluiu-se que os valores obtidos no presente trabalho apresentam uma gama mais ampla de resultados; isto está relacionado com o facto de algumas amostras serem de natureza diferente.

Com os resultados obtidos foi possível determinar equivalentes de retinol (RE) e, desse modo, concluiu-se que algumas amostras apresentavam elevada atividade como vitamina A. É de salientar que as amostras com valores mais elevados de RE foram a nabiças (RE = 869

$\mu\text{g}/100\text{ g}$ ) e a cenoura ( $\text{RE} = 2710\text{ }\mu\text{g}/100\text{ g}$ ). No entanto, algumas amostras apresentaram valores de RE muito baixos, como couve-flor ( $0,5\text{ }\mu\text{g}/100\text{ g}$ ), couve-de-Bruxelas ( $1,9\text{ }\mu\text{g}/100\text{ g}$ ) e milho ( $2,3\text{ }\mu\text{g}/100\text{ g}$ ). As restantes amostras apresentam valores entre  $7,7\text{ }\mu\text{g}/100\text{ g}$  (azeitona) e  $52\text{ }\mu\text{g}/100\text{ g}$  (manteiga com sal).

Pela pesquisa bibliográfica concluiu-se que o método de análise mais utilizado na determinação deste tipo de compostos continua a ser HPLC, no entanto já estão a ser estudados e colocados em prática novos métodos de análise de carotenoides como é o caso do UHPLC.

O presente trabalho foi alvo de apresentações sobre a forma de 3 painéis, no Fórum de Engenharia Química e Biológica no ISEL, no XIII Encontro Química Alimentos no Porto e na 9ª Reunião Anual do PortFir no INSA em Lisboa, sendo apresentados nos Anexos 10, 11 e 12, respetivamente.





## 7. Proposta de trabalho futuro

De seguida são apresentadas algumas propostas para um trabalho futuro as quais estão relacionadas com o presente trabalho:

- Validação completa do método analítico para a determinação de carotenoides em amostras de pratos compostos com teor de gordura superior a 10%, recorrendo aos métodos de saponificação desenvolvidos neste trabalho;
- Realização de estudos sobre o efeito de sazonalidade em mais amostras de produtos hortícolas ou que os contenham como ingredientes em quantidades significativas;
- Aplicação de outra técnica de análise para além do HPLC, como por exemplo UHPLC, com vista a reduzir a quantidade de solventes e assim diminuir o impacto ambiental;
- Avaliação da ingestão de carotenoides e pró-vitamina A pelos portugueses tendo em consideração os consumos e os resultados analíticos obtidos.



## 8. Referências Bibliográficas

Agarwal S., Rao A.V. (2000), *Tomato lycopene and its role in human health and chronic diseases*, Canadian Medical Association Journal 163(6), p. 739-744

Ambrósio C.L.B., Campos F.A.C.S., Faro Z.P. (2006), *Carotenoides como alternativa contra a hipovitaminose A*, Revista de Nutrição 19, p. 233-243

Amorim-Carrilho K.T., Cepeda A., Fente C., Regal P. (2014), *Review of methods for analysis of carotenoids*, Trends in Analytical Chemistry 56, p. 49-73

Andrade K.P., Alencar L., Bragança R.N.P., Furtunato D.M.N. (2008), *A importância do preparo da amostra para o sucesso da análise de alimentos*, Higiene Alimentar 22 (160), p. 38-41

Arathi B.P., Sowmya R.-R., Vijay K., Baskaran V., Lakshminarayana R. (2015), *Metabolomics of carotenoids: the challenges and prospects – a review*, Trends in Food Science & Technology 45, p. 105-117

Ball G.F.M. (1988), *Fat-soluble vitamin assays in food analysis - A comprehensive Review*, Elsevier Applied Science

Baltschun D., Beutner S., Briviba K., Martin H.D., Paust J., Peters M., Rfver S., Sies H., Stahl W., Steigel A., Stenhorst F. (1997), *Singlet oxygen quenching abilities of carotenoids*, Liebigs Annalen, p. 1887-1893

Basho S.M., Bin M.C. (2010), *Properties of functional foods and their role in the prevention and control of hypertension and diabetes*, Interbio 4, p. 48-58

Basu H.N., Del Vecchio A.J., Flider F., Orthoefer F.T. (2001), *Nutritional and potential disease prevention properties of carotenoids*, Journal of the American Oil Chemists' Society 78, p. 665-675

Bendich A., Olson J.A. (1989), *Biological actions of carotenoids*, FASEB Journal 3, p. 1927-1932

- Benítez-García I., Vanegas-Espinoza P.E., Meléndez-Martínez A.J., Heredia F.J., Paredes-López O., Villar-Martínez A.A.D. (2014), *Callus culture development of two varieties of Tagetes erecta and carotenoid production*, Electronic Journal of Biotechnology 17, p. 107-113
- Bernstein P.S., Li B., Vachali P.P., Gorusupudi A., Shyam R., Henriksen B.S., Nolan J.M. (2016), *Lutein, zeaxanthin, and meso-zeaxanthin: the basic and clinical science underlying carotenoid-based nutritional interventions against ocular disease*, Progress in Retinal and Eye Research 50, p. 34-66
- Bijttebie S., D'Hondt E., Notena B., Hermans N., Apers S., Voorspoels S. (2014), *Ultra high performance liquid chromatography versus high performance liquid chromatography: stationary phase selectivity for generic carotenoid screening*, Journal of Chromatography A 1332, p. 46-56
- Blot W.J., Li J.-Y., Taylor P.R., Guo W., Dawsey S., Wang G.-Q., Yang C.S., Zheng S.-F., Gail M., Li G.-Y., Yu Y., Liu B., Tangrea J., Sun Y., Liu F., Fraumeni J.F., Zhang Y.-H., Li B. (1993), *Nutrition intervention trials in Linxian, China: supplementation with specific vitamin/ mineral combinations, cancer incidence, and disease-specific mortality in the general population*, Journal of the National Cancer Institute 85, p. 1483-1492
- Boeing H., Bechthold A., Bub A., et al. (2012), *Critical review: vegetables and fruit in the prevention of chronic diseases*, European Journal of Nutrition 51(6), p. 637-663
- Bone R.A., Landrum J.T., Friedes L.M., Gomez C.M., Kilburn M.D., Menendez E., Vidal I., Wang W. (1997), *Distribution of lutein and zeaxanthin stereoisomers in the human retina*, Experimental Eye Research 64, p. 211-218
- Britton G. (1995), *Structure and properties of carotenoids in relation to function*, FASEB Journal 9, p. 1551–1558

- Britton G. (2008), *Function of intact carotenoids*. In: Britton G., Liaaen-Jensen S., Pfander H. (Eds.), *Carotenoids*, Springer, New York, p. 189–212
- Britton G., Khachik F. (2009), *Carotenoids in food*. In: Britton G., Liaaen-Jensen S., Pfander H. (Eds.), *Carotenoids*, Springer, New York, p. 45–66
- Campos F.M., Rosado G.P (2005), *Novos factores de conversão de carotenoides provitamínicos A*, *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 25, p. 571-578
- Castenmiller J.J.M., West C.E. (1998), *Bioavailability and bioconversion of carotenoids*, *Annual Review of Nutrition* 18, p. 19-38
- Chief W.E.M., Chief J.R.J. (2002), *Certificate of analysis – standard reference material ® 2383*, National Institute of Standards & Technology
- Cho E., Hankinson S.E., Rosner B., Willett W.C., Colditz G.A. (2008), *Prospective study of lutein/zeaxanthin intake and risk of age-related macular degeneration*, *The American Journal of Clinical Nutrition* 87, p. 1837-1843
- Ciccone M.M., Cortese F., Gesualdo M., Carbonara S., Zito A., Ricci G., Pascalis F.D., Schicchitano P., Rccioni G. (2013), *Review Article – Dietary intake of carotenoids and their antioxidante and anti-inflammatory effects in cardiovascular care*, *Mediators of Inflammation* 2013, p. 1-11
- Claessens H.A., Van Straten M.A. (2004), *Review on the chemical and thermal stability of stationary phases for reversed-phase liquid chromatography*, *Journal of Chromatography A* 1060, p. 23-41
- Clinton S.K. (1998), *Lycopene: chemistry, biology, and implications for human health and disease*, *Nutrition Reviews* 56(2), p. 31-35
- Collins A.R. (2001), *Carotenoids and genomic stability*, *Mutation Research* 475, p. 21-28
- Cooper D.A., Eldridge A.L., Peters J.C. (1999), *Dietary carotenoids and certain cancers, heart disease, and age-related macular degeneration: a review of recent research*, *Nutritions Reviews* 57(7), p. 201-214

- Degani A.L.G., Cass Q.B., Vieira P.C. (1998), *Cromatografia – um breve ensaio*, Revista Química Nova na Escola 7, p. 21-25
- Dias M.G., Camões M.F., Oliveira L. (2012), *Measurement uncertainty of food carotenoid determination*, Accreditation and Quality Assurance 17, p. 183-189
- Dias M.G., Camões M.F.G.F.C, Oliveira L. (2009), *Carotenoids in traditional portuguese fruits and vegetables*, Food Chemistry 113, p. 808-815
- Dias M.G., Camões M.F.G.F.C., Oliveira L. (2008), *Uncertainty estimation and in-house method validation of HPLC analysis of carotenoids for food composition data production*, Food Chemistry 109, p. 815-824
- Dias M.G., Oliveira L., Camões M.F.G.F.C., Nunes B., Versloot P., Hulshof P.J.M. (2010), *Critical assessment of three high performance liquid chromatography analytical methods for food carotenoid quantification*, Journal of Chromatography A 1217, p. 3494-3502
- Edge R., Mcgarvey D.J., Truscott T.G. (1997), *The carotenoids as anti-oxidants – a review*, Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology 41, p. 189-200
- Eitenmiller R.R., Landen W.O., Jr., Ye L. (2007), *Vitamin analysis for the health and food sciences*, Boca Raton Florida 33487, USA: CRC press, Taylor & Francis Group
- Ekesa B., Poulaert M., Davey M.W., Kimiywe J., van den Bergh I., Nlomme G., et al. (2012), *Bioaccessibility of provitamin A carotenoids in bananas (Musa spp.) and derived dishes in African countries*, Food Chemistry 133, p. 1471-1477
- Elliott R. (2005), *Mechanisms of genomic and non-genomic actions of carotenoids*, Biochimica et Biophysica Acta 1740, p. 147-154
- Epler K.S., Sander L.C., Ziegler R.G., Wise S.A., Craft N.E. (1992), *Evaluation of reversed-phase liquid chromatographic columns for*

*recovery and selectivity of selected carotenoids*, Journal of Chromatography A 595, p. 89–101

Erdman Jr. J.W., Bierer T.L., Gugger E.T. (1993), *Absorption and transport of carotenoids*, Annals of the New York Academy of Science 691, p. 76-85

Esteban R., Moran J.F., Becerril J.M., García-Plazaola J.I. (2015), *Versatility of carotenoids: na integrated view on diversity, evolution, functional roles and environmental interactions*, Environmental and Experimental Botany 119, p. 63-75

Failla M.L., Chitchumronchokchai C. (2004), *In vitro Models as Tools for Screening the Relative Bioavailabilities of Provitamin A Carotenoids Foods*, HarvestPlus Technical Monograph Series 3, International Food Policy Research Institute

Fearn T., Thompson M. (2001), *A new test for “sufficient homogeneity”*, Analyst 126, p. 1414-1417

Fernández-García E., Carvajal-Lérida I., Jarén-Galán M., Garrido-Fernández J., Pérez-Gálvez A., Hornero-Méndez D. (2012), *Carotenoids bioavailability from foods: from plants pigments to eficiente biological activities*, Food Research International 46, p. 438-450

Fiedor J., Burda K. (2014), *Potential role of carotenoids as antioxidants in human health and disease*, Nutrients 6, p.466-488

Fraser P.D., Bramley P.M. (2004), *The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids*, Progress in Lipid Research 43, p. 228-265

Furr H.C., Clark R.M. (1997), *Intestinal absorption and tissue distribution of carotenoids*, Nutritional Biochemistry 8, p. 364-377

Garrett D.A., Failla M.L., Sarama R.J.(1999), *Development of an in vitro digestion method to assess carotenoid bioavailability from meals*, Journal of Agricultural & Food Chemistry 47, p. 4301-4309

Gondim C.S., Junqueira R.G., Souza S.V.C. (2011), *Tendências em validação de métodos de ensaios qualitativos – artigo de revisão*, Revista do Instituto Adolfo Lutz 70(4), p.433-447

Gori T., Münzel T. (2011), *Oxidative stress and endothelial dysfunction: therapeutic implications*, Annals of Medicine 43(4), p. 259-272

Goulinet S., Chapman M.J. (1997), *Plasma LDL and HDL subspecies are heterogenous in particle content of tocopherols and oxygenated and hydrocarbon carotenoids. Relevance to oxidative resistance and atherogenesis*, Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 17, p. 786–796

Greenfield H., Southgate D.A.T. (2003), *Food composition data. Production, management and use*, 2ª edição, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Roma

Guimarães E.C.B.T., Ávila A.K., Oliveira A.R., Lemos I.M.G., Higashi K., Leal O.B.R., Martins P.R. (2007), *Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos – DOQ-CGCRE-008*, Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial

Gupta P., Sreelakshmi Y., Sharma R. (2015), *A rapid and sensitive method for determination of carotenoids in plant tissues by high performance liquid chromatography*, Plant Methods 1, p. 1-5

Halliwel B. (1996), *Antioxidants in human health and disease*, Annual Review of Nutrition 16, p. 33-50

He F.J., Nowson C.A., Lucas M., MacGregor G.A. (2007), *Increased consumption of fruit and vegetables is related to a reduced risk of coronary heart disease: meta-analysis of cohort studies*, Journal of Human Hypertension 21(9), p. 717-728

Hirayama O., et al. (1994), *Singlet oxygen quenching ability of natural occurring carotenoids*, Lipids 29, p. 149-150

International Standard Organization (2005); *General Requirements for the Competence of Testing and Calibration Laboratories*, ISO/IEC 17025



- Johnson E.J. (2002), *The role of carotenoids in human health*, Nutrition in Clinical Care 5(2), p. 47-49
- Junior O.P.A., Caldas E.P.A., Brito N.M., Santos T.C.R, Vale M.L.B.F. (2001), *Validação de métodos analíticos: uma breve revisão*, Cadernos de Pesquisa (São Luís) 12:1/2, p. 116-131
- Khachik F. (2006), *Distribution and metabolism of dietary carotenoids in humans as a criterion for development of nutritional supplements*, Pure and Applied Chemistry 78, p. 1551-1557
- Khachik F., Moura F.F., Zhao D.Y., Aebischer C.P., Bernstein P.S. (2002), *Transformations of selected carotenoids in plasma, liver, and ocular tissues of humans and in nonprimate animal models*, Investigative Ophthalmology & Visual Science 43, p. 3383-3392
- Khachik F., Spangler C.J., Smith J.C., Canfield L.M., Steck A., Pfander H. (1997), *Identification, quantification, and relative concentrations of carotenoids and their metabolites in human milk and serum*, Analytical Chemistry 69, p. 1873-1881
- Khoo H.E., Prasad K.N., Kong K.W., Jiang Y., Ismail A. (2011), *Carotenoids and their isomers: color pigments in fruits and vegetables*, Molecules 16, p. 1710-1738
- Klein R., Wang Q., Klein B.E., Moss S.E., Meuer S.M. (1995), *The relationship of age-related maculopathy, cataract, and glaucoma to visual acuity*, Investigative Ophthalmology & Visual Science 36, p. 182-191
- Kohlmeier L., Kark J.D., Gomez-Garcia E., Martin B.C., Steck S.E., Kardinaal A.F. (1997), *Lycopene and myocardial infarction risk in the EURAMIC study*, American Journal of Epidemiology 146, p.618–626
- Krinsky N.I., Johnson E.J. (2005), *Carotenoid actions and their relation to health and disease*, Molecular Aspects of Medicine 26, 459-516
- Kritchevsky S.B. (1999),  *$\beta$ -Carotene, Carotenoids and the Prevention of Coronary Heart Disease*, The Journal of Nutrition 129, p. 5-8

Layne J. (2002), *Characterization and comparison of the chromatographic performance of conventional, polar-embedded, and polar-endcapped reversed-phase liquid chromatography stationary phases*, Journal of Chromatography A 957(2), p. 149-164

Li B., Zhao H, Liu J., Liu W., Fan S., Wu G., Zhao R. (2015), *Application of ultra-high performance supercritical fluid chromatography for the determination of carotenoids in dietary supplements*, Journal of Chromatography A 1425, p. 287-292

Li H., Deng Z., Wu T., Liu R., Loewen S., Tsao R. (2012), *Microwave-assisted extraction of phenolics with maximal antioxidant activities in tomatoes*, Food Chemistry 130, p. 928-936

Liga Portuguesa contra o cancro, consultado a 15 de abril de 2016:  
<https://www.ligacontracancro.pt/o-que-e-o-cancro/>

Lu S., Li L. (2008), *Carotenoid metabolism: Biosynthesis, regulation, and beyond*, Journal of Integrative Plant Biology 50, p. 778-785

Mandalari G., Bisignano C., Filocamo A., Chessa S., Saro M., Torre G., *et al.* (2013), *Bioaccessibility of pistacho polyphenol, xanthophylls and tocopherols during simulated human digestion*, Nutrition 29, p. 338-344

Mangione C.M., Gutierrez P.R., Lowe G., Orav E.J., Seddon J.M. (1999), *Influence of age-related maculopathy on visual functioning and health-related quality of life*, American Journal of Ophthalmology 128, p. 45-53

Mayne S.T. (1996), *Beta-carotene, carotenoids, and disease prevention in humans*, FASEB Journal 10, p. 690-701

Meléndez-Martínez A., Britton G., Vicario I.M., Heredia F.J. (2007), *Relationship between the colour and the chemical structure of carotenoid pigments*, Food Chemistry 101, p. 1145–1150

Meléndez-Martínez A.J., Vicario I.M., Heredia F.J. (2004), *Stability of carotenoid pigments in foods*, Archivos Latinoamericanos de Nutricion 54 (2), p. 209-215

- Miller J.N., Miller J.C. (2010), *Satistics and chemometrics for analytical chemistry*, 6ª edição, Pearson Education Limited, England
- Mínguez-Mosquera M. I., Hornero-Méndez D. (1997), *Changes in provitamin A during paprika processing*, Journal of Food Protection 60, p. 853-857
- Ministério da Saúde (1996), Instituto Nacional de Câncer, Coordenação Nacional de Controle de Tabagismo (CONTAPP), *Falando Sobre Câncer e Seus Fatores de Risco*, Rio de Janeiro, consultado a 23 de julho de 2002: <http://www.inca.org.br/cancer/causacancer.html>
- Murillo E., Giuffrida D., Menchaca D., DugoP., Torre G., Meléndez-Martínez A.J., Mondello L. (2013), *Native carotenoids composition of some tropical fruits*, Food Chemistry 140, p. 825-836
- Namitha K.K., Negi P.S. (2010), *Chemistry and biotechnology of carotenoids*, Critical Reviews in Food Science and Nutrition 50(8), p. 728–760
- Nollet L.M.L., Toldrá F. (2013), *Food analysis by HPLC*, 3rd ed., CRC Press
- Omaye S.T., Krinsky N.I., Kagan V.E., Mayne S.T., Liebler D.C., Bidlack W.R. (1997),  *$\beta$ -Carotene: friend or foe?*, Fundamental and Applied Toxicology 40, p. 163-174
- Omenn G.S. (1998), *Chemoprevention of lung cancer: the rise and demise of beta-carotene*, Annual Review Public Health 19, p. 73-99
- Paula T.P., Peres W.A.F., Carmo M.G.T. (2004), *Carotenoids in treatment and prevention of cancer*, Revista Brasileira de Nutrição Clínica 19(2), p. 100-108
- Pelissari F.M., Rona M.S.S., Matioli G. (2008), *O Licopeno e suas contribuições na prevenção de doenças*, Arq Mudi 12, p. 5-11
- Programa Nacional para as Doenças Oncológicas (2016), *Portugal – Doenças Oncológicas em Números - 2015*, Direção-Geral da Saúde, consultado a 15 de abril de 2016: <http://www.dgs.pt/?cr=29496>

- Rajendran V., Pu Y.S., Chen B.H. (2005), *An improved HPLC method for determination of carotenoids in human serum*, Journal of Chromatography B 824, p. 99-106
- Rao A.V., Rao L.G. (2007), *Carotenoids and human health*, Pharmacological Research 55, p. 207-216
- Relacre (2000), *Guia Relacre 13 - Validação de Métodos Internos de Ensaio em Análise Química*, IPQ, Portugal
- Ribani M., Bottoll G., Collins C.H., Jardim I.C.S.F, Melo L.F.C (2004), *Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos*, Química Nova 27(5), p. 771-780
- Ribaya-Mercado J.D., Blumberg J.B. (2004), *Lutein and zeaxanthin and their potential roles in disease prevention*, Journal of the American College of Nutrition 23(6), p. 567S-87S
- Riccioni G., D'Orazio N., Franceschelli S., Speranza L. (2011), *Marine carotenoids and cardiovascular risk markers*, Marine Drugs 9(7), p. 1166-1175
- Richer S., Stiles W., Statkute L., Pulido J., Frankowski J., Rudy D., Pei K., Tsiপুরsky M., Nyland J. (2004), *Double-masked, placebo-controlled, randomized trial of lutein and antioxidant supplementation in the intervention of atrophic age-related macular degeneration: the Veterans LAST study (Lutein Antioxidant Supplementation Trial)*, Optometry 75, p. 216-230
- Rios A.O., Antunes L.M.G., Bianchi M.L.P. (2009), *Proteção de carotenoides contra radicais livres gerados no tratamento de câncer com cisplatina*, Alimentos e Nutrição 20, p. 343-350
- Riso P., Visioli F., Erba D., Testolin G., Porrini M. (2004), *Lycopene and vitamin C concentrations increase in plasma and lymphocytes after tomato intake. Effects on cellular antioxidant protection*, European Journal of Clinical Nutrition 58, p. 1350-1358

Rodić Z., Simonovska B., Albreht A., Vovk (2012), *Determination of lutein by high-performance thin-layer chromatography using densitometry and screening of major dietary carotenoids in food supplements*, Journal of Chromatography A 1231, p. 59-65

Rodriguez-Amaya D.B. (2001), *A guide to carotenoid analysis in foods*, ILSI Human Nutrition Institute. One Thomas Circle, NW, Washington DC, 20005-5802, p. 64

Rodriguez-Amaya D.B. (2010), *Quantitative analysis, in vitro assessment of bioavailability and antioxidante activity of food carotenoids – a review*, Journal of Food Composition and Analysis 23, p. 726-740

Rodriguez-Amaya D.B. (2015), *Status of carotenoid analytical methods and in vitro assays for the assessment of food quality and health effects*, Current Opinion in Food Science (Elsevier) 1, p. 56-63

Rodriguez-Amaya D.B., Kimura M. (2004), *HarvestPlus Handbook for Carotenoid Analysis*, HarvestPlus Technical Monograph 2, Cali: International Food Policy Research Institute (IFPRI) and International Center for Tropical Agriculture (CIAT), Washington, DC

Rodriguez-Roque M.J., Rojas-Grau M.A., Elez-Martinez P., Martin-Belloso O. (2013), *Changes in vitamin C, phenolic, and carotenoid profiles throughout in vitro gastrointestinal digestion of a blended fruit juice*, Journal of Agricultural & Food Chemistry 61, p. 1859-1867

Roman M.J., Burri B.J., Singh R.P. (2012), *Release and bioaccessibility of  $\beta$ -carotene from fortified almond butter during in vitro digestion*, Journal of Agricultural & Food Chemistry 60, p. 9659-9666

Saini R.K., Nile S.H., Park S.W. (2015), *Carotenoids from fruits and vegetables: chemistry, analysis, occurrence, bioavailability and biological activities*, Food Research International 76, p.735-750

Sander L.C., Sharpless K.E., Pursch M. (2000), *C30 stationary phases for the analysis of food by liquid chromatography*, Journal of Chromatography A 880, p. 189-202

Schalch W. (1992), *Carotenoids in the retina—a review of their possible role in preventing or limiting damage caused by light and oxygen*. In: Emerit I., Chance B. (Eds.), *Free Radicals and Aging*, Birkhäuser Verlag, Basel

Schmidt R. (2004), *Deactivation of singlet oxygen by carotenoids: internal conversion of excited encounter complexes*, Journal of Physical Chemistry 108, p. 5509-5513

Seddon J.M., Ajani U.A., Sperduto R.D., Hitler K., Blair N., Burton T.C., Farber M.D., Cragoudos E.S., Haller J., Miller D.T., *et al.* (1994), *Dietary carotenoids, vitamins A, C, and E, and advanced age-related macular degeneration. Eye disease case-control study group*, American Medical Association 272, p. 1413-1420

Send R., Sundholm D. (2007), *The role of the  $\beta$ -ionone ring in the photochemical reaction of rhodopsin*, The Journal of Physical Chemistry A 111(1), p. 27-33

Sies H. (1986), *Biochemistry of oxidative stress*, Angewandte Chemie International Edition in English 25, p. 1058-1071

Silva M.A.M.M. (2014), *Contributo para a determinação simultânea, por cromatografia líquida de alta resolução, de carotenoides, vitamina A e vitamina E em amostras compostas por diferentes matrizes alimentares*, Trabalho Final de Mestrado, Instituto Superior de Engenharia de Lisboa

Silveira A.L.C. (2013), *Validação de métodos para determinação de compostos fenólicos em melancia*, Tese de Mestrado em Inovação e Qualidade na Produção Alimentar, Instituto Politécnico de Castro Branco – Escola Superior Agrária, Agosto de 2013, 83 p.

Skoog D.A., Holler F.J., Crouch S.R. (2007), *Principles of Instrumental Analysis*, 6th ed., Thomson Brooks/Cole

Snyder L.R., Kirkland J.J., Dolan J.W. (2010), *Introduction to modern liquid chromatography*, 3rd ed., Wiley

- Stahl W., Sies H. (1993), *Physical quenching of singlet oxygen and cis-trans isomerization of carotenoids*, Annals of the New York Academy of Sciences 691, p. 10-19
- Stahl W., Sies H. (2003), *Antioxidant activity of carotenoids*, Molecular Aspects of Medicine 24, p. 345-351
- Stahl W., Sies H. (2005), *Bioactivity and protective effects of natural carotenoids*, Biochimica et Biophysica Acta 1740, p. 101-107
- Stahl W., Sundquist A.R., Sies H. (1994), *Role of carotenoids in antioxidant defense*. In: Blomhoff R. (Ed.), *Vitamin A in Health and Disease*, Marcel Dekker, New York
- Stratton S.P., Schaefer W.H., Liebler D.C. (1993), *Isolation and identification of singlet oxygen oxidation products of  $\beta$ -carotene*, Chemical Research in Toxicology 6, p. 542-547
- Sy C., Gleise B., Dangles O., Landrier J., Veyrat C.C., Borel P. (2012), *Effects of physicochemical properties of carotenoids on their bioaccessibility, intestinal cell uptake, and blood and tissue concentrations*, Molecular Nutrition & Food Research 56, p. 1385-1397
- Tapiero H., Townsend D.M., Tew K.D. (2004), *The role of carotenoids in the prevention of human pathologies*, Biomedicine & Pharmacotherapy 58 (2), p. 100-110
- van het Hof K.H., West C.E., Weststrate J.A., Hautvast J.G.A.J. (2000), *Dietary factors that affect the bioavailability of carotenoids*, The Journal of Nutrition 130, p. 503-506
- Wackerbarth H., Stoll T., Gebken S., Pelters C., Bindrich U. (2009), *Carotenoid- protein interaction as an approach for the formulation of functional food emulsions*, Food Research International 42, p. 1254-1258
- Wang X.D., Liu C., Bronson R.T., Smith D.E., Krinsky N.I., Russell R.M. (1999a), *Retinoid signaling and activator protein-1 expression in ferrets given h-carotene supplements and exposed to tobacco smoke*, Journal of the National Cancer Institute 91, p. 60-66

Wang X.D., Russell R.M. (1999b), *Procarcinogenic and anticarcinogenic effects of  $\beta$ -carotene*, Nutrition Reviews 57, p. 263-272

Waters, How Does High Performance Liquid Chromatography Work? (2016), Waters, The science of what's possible, consultado a 24 de Agosto de 2016: [http://www.waters.com/waters/en\\_US/How-Does-High-Performance-Liquid-Chromatography-Work%3F/nav.htm?locale=en\\_us&cid=10049055](http://www.waters.com/waters/en_US/How-Does-High-Performance-Liquid-Chromatography-Work%3F/nav.htm?locale=en_us&cid=10049055)

Weisburger J.H. (2002), Lycopene and tomato products in health promotion, Experiments in Biology and Medicine 227, p. 924-927

Wen X., Wu J., Wang F., Liu B., Huang C., Wei Y. (2013), *Deconvoluting the role of reactive oxygen species and autophagy in human diseases*, Free Radical Biology and Medicine 65, p. 402-410

World Health Organization (2003), *The World Health Report 2003: Shaping the Future*, World Health Organization, Geneva, Switzerland

Yeum K.J., Russell R.M. (2002), *Carotenoid bioavailability and bioconversion*, Annual Review of Nutrition 22, p. 483-504

Yonekura L., Nagao A. (2007), *Intestinal absorption of dietary carotenoids*, Molecular Nutrition & Food Research 51, p. 107-115

Zaripheh S., Erdman Jr. J.W. (2002), *Factors that influence the bioavailability of xanthophylls*, The Journal of Nutrition 132, p. 531S-534S

Zoonen P. van, Hoogerbrugge R., Gort S.M., Wiel H.J. van de, Klooster H.A. van't (1999), *Some practical examples of method validation in the analytical laboratory*, Trends in Analytical Chemistry 18:9-10, p. 584-593



## Anexos



# Anexo 1 – Tabela do teste de Cochran

Valores Crítico para o teste de Cochran.  
Nível de significância de 5%

k \ n	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	17	37	145	∞
2	0,9985	0,9750	0,9392	0,9057	0,8772	0,8534	0,8332	0,8159	0,8010	0,7880	0,7341	0,6602	0,5813	0,5000
3	0,9669	0,8709	0,7977	0,7457	0,7071	0,6771	0,6530	0,6333	0,6167	0,6025	0,5466	0,4748	0,4031	0,3333
4	0,9065	0,7679	0,6841	0,6287	0,5895	0,5598	0,5365	0,5175	0,5017	0,4884	0,4366	0,3720	0,3093	0,2500
5	0,8413	0,6838	0,5931	0,5441	0,5065	0,4783	0,4564	0,4387	0,4241	0,4118	0,3645	0,3066	0,2513	0,2000
6	0,7808	0,6161	0,5321	0,4803	0,4447	0,4194	0,3980	0,3817	0,3682	0,3568	0,3135	0,2612	0,2119	0,1667
7	0,7271	0,5612	0,4800	0,4307	0,3974	0,3726	0,3535	0,3384	0,3299	0,3154	0,2756	0,2278	0,1833	0,1429
8	0,6798	0,5157	0,4377	0,3910	0,3595	0,3362	0,3185	0,3043	0,2926	0,2829	0,2462	0,2022	0,1616	0,1250
9	0,6385	0,4775	0,4027	0,3584	0,3286	0,3067	0,2901	0,2768	0,2659	0,2568	0,2226	0,1820	0,1446	0,1111
10	0,6020	0,4450	0,3733	0,3311	0,3029	0,2823	0,2666	0,2541	0,2439	0,2353	0,2032	0,1655	0,1308	0,1000
12	0,5410	0,3924	0,3264	0,2880	0,2624	0,2439	0,2299	0,2187	0,2098	0,2020	0,1737	0,1403	0,1100	0,0833
15	0,4709	0,3346	0,2758	0,2419	0,2195	0,2034	0,1911	0,1815	0,1736	0,1671	0,1429	0,1144	0,0889	0,0667
20	0,3894	0,2705	0,2205	0,1921	0,1735	0,1602	0,1501	0,1422	0,1357	0,1303	0,1108	0,0879	0,0675	0,0500
24	0,3434	0,2354	0,1907	0,1656	0,1493	0,1374	0,1246	0,1216	0,1160	0,1113	0,0942	0,0743	0,0567	0,0417
30	0,2929	0,1980	0,1593	0,1377	0,1237	0,1137	0,1061	0,1002	0,0958	0,0921	0,0771	0,0604	0,0457	0,0333
40	0,2370	0,1576	0,1259	0,1082	0,0968	0,0887	0,0827	0,0780	0,0745	0,0713	0,0595	0,0462	0,0347	0,0250
60	0,1737	0,1131	0,0895	0,0765	0,0682	0,0625	0,0583	0,0552	0,0520	0,0497	0,0411	0,0316	0,0234	0,0167
120	0,0998	0,0632	0,0495	0,0419	0,0371	0,0337	0,0312	0,0292	0,0279	0,0266	0,0218	0,0165	0,0120	0,0083
∞	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000



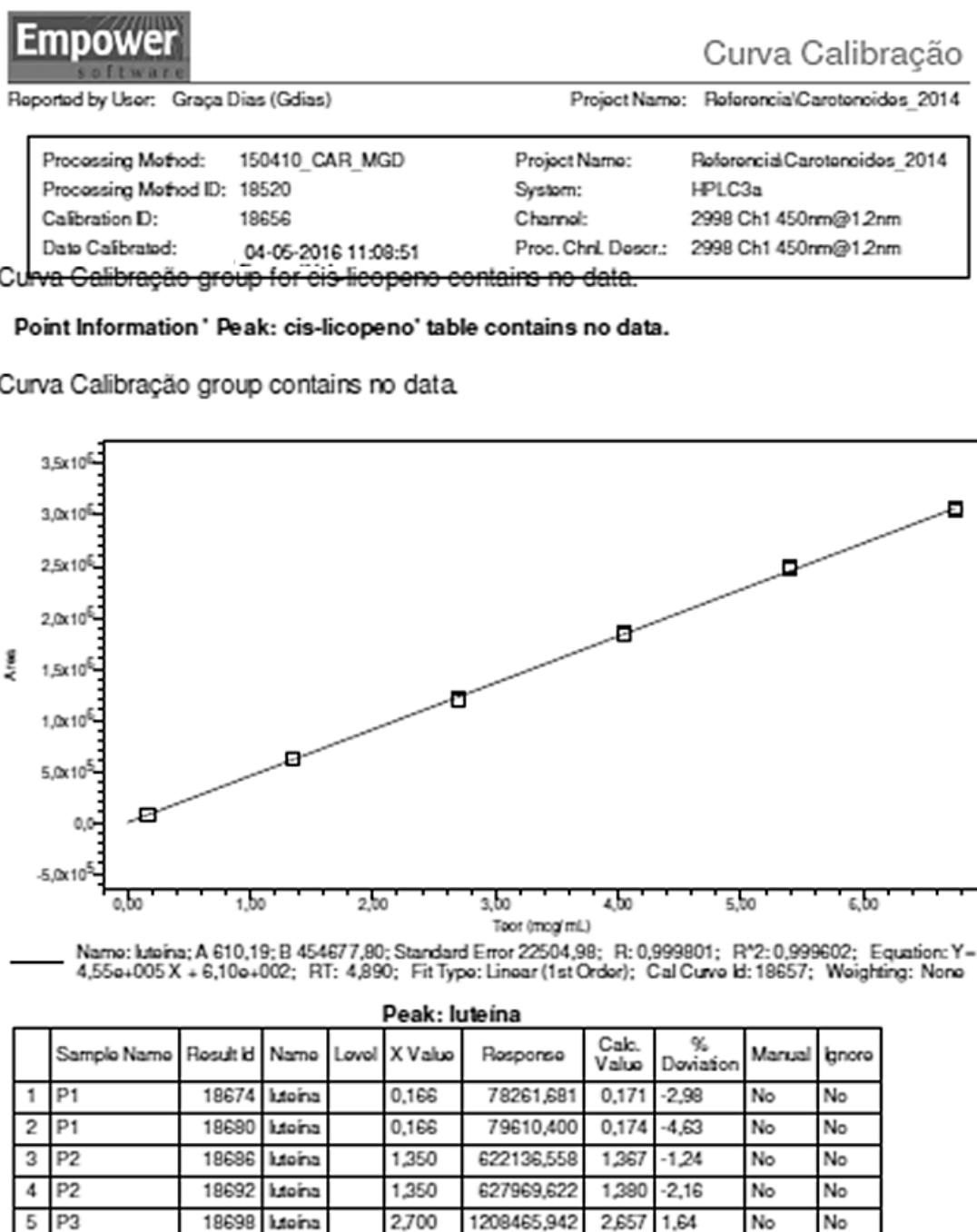
## Anexo 2 – Comprimento de onda de absorção máxima dos carotenoides

**Tabela A2.1.** Comprimento de onda de absorção máxima dos carotenoides

	<b>Solvente</b>	<b><math>\lambda</math> (nm)</b>
<b><math>\alpha</math>-caroteno</b>	Hexano	444
<b><math>\beta</math>-caroteno</b>	Hexano	450
<b><math>\beta</math>-criptoxantina</b>	Hexano	451
<b>Licopeno</b>	Hexano	472
<b>Luteína</b>	Etanol	445
<b>Zeaxantina</b>	Etanol	450



## Anexo 3 – Folha de Resultados referente às curvas de calibração de cada um dos carotenoides em estudo





# Curva Calibração

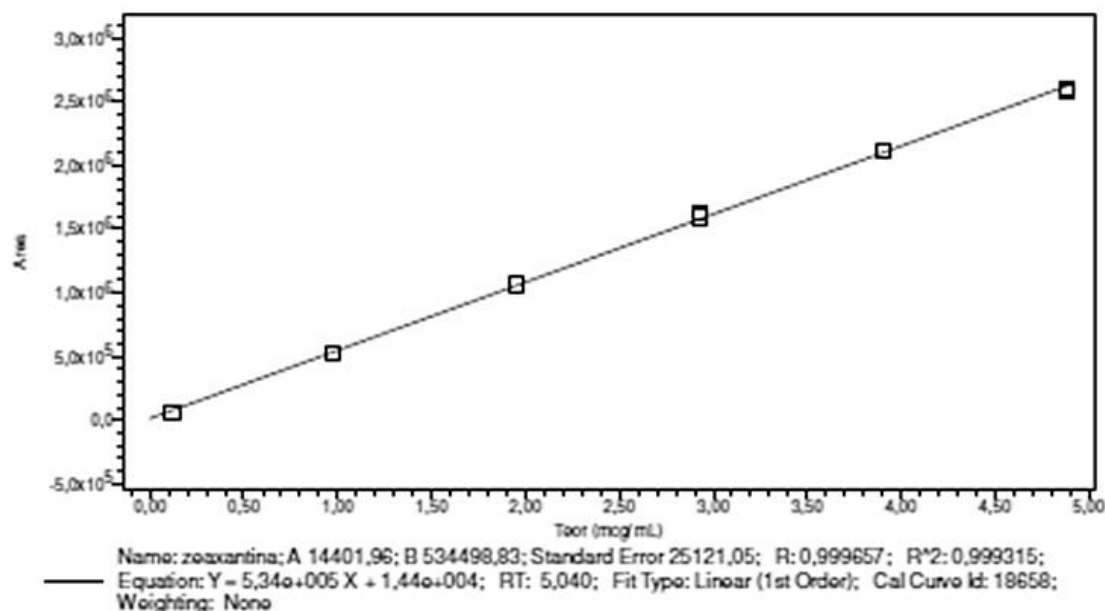
Reported by User: Graça Dias (Gdias)

Project Name: Referencial/Carotenoides\_2014

Processing Method:	150410_CAR_MGD	Project Name:	Referencial/Carotenoides_2014
Processing Method ID:	18520	System:	HPLC3a
Calibration ID:	18656	Channel:	2998 Ch1 450nm@12nm
Date Calibrated:	04-06-2016 11:09:51	Proc. Chnl. Descr.:	2998 Ch1 450nm@12nm

## Peak: luteína

	Sample Name	Result Id	Name	Level	X Value	Response	Calc. Value	% Deviation	Manual	Ignore
6	P3	18704	luteína		2,700	1190665,307	2,617	3,16	No	No
7	P4	18710	luteína		4,050	1832947,078	4,030	0,50	No	No
8	P4	18716	luteína		4,050	1849046,024	4,065	-0,38	No	No
9	P5	18720	luteína		5,400	2494712,938	5,485	-1,56	No	No
10	P5	18724	luteína		5,400	2479704,245	5,452	-0,96	No	No
11	P6	18730	luteína		6,750	3067672,733	6,746	0,07	No	No
12	P6	18736	luteína		6,750	3041715,506	6,688	0,92	No	No







## Curva Calibração

Reported by User: Graça Dias (Gdias)

Project Name: Referencia/Carotenoides\_2014

Processing Method:	150410_CAR_MGD	Project Name:	Referencia/Carotenoides_2014
Processing Method ID:	18520	System:	HPLC3a
Calibration ID:	18656	Channel:	2998 Ch1 450nm@1.2nm
Date Calibrated:	04-05-2016 11:08:51	Proc. Chnl. Descr.:	2998 Ch1 450nm@1.2nm

## Peak: zeaxantina

	Sample Name	Result Id	Name	Level	X Value	Response	Calc. Value	% Deviation	Manual	Ignore
1	P1	18674	zeaxantina		0,122	64853,837	0,094	29,14	No	No
2	P1	18680	zeaxantina		0,122	65908,475	0,096	26,50	No	No
3	P2	18686	zeaxantina		0,977	531903,186	0,968	0,88	No	No
4	P2	18692	zeaxantina		0,977	526011,768	0,957	2,04	No	No
5	P3	18698	zeaxantina		1,953	1066822,316	1,969	-0,79	No	No
6	P3	18704	zeaxantina		1,953	1063811,063	1,963	-0,51	No	No
7	P4	18710	zeaxantina		2,930	1626123,351	3,015	-2,83	No	No
8	P4	18716	zeaxantina		2,930	1595874,566	2,959	-0,97	No	No
9	P5	18720	zeaxantina		3,907	2118347,303	3,936	-0,75	No	No
10	P5	18724	zeaxantina		3,907	2122159,909	3,943	-0,93	No	No
11	P6	18730	zeaxantina		4,884	2575225,955	4,791	1,93	No	No
12	P6	18736	zeaxantina		4,884	2607442,803	4,851	0,66	No	No



# Curva Calibração

Reported by User: Graça Dias (Gdias)

Project Name: Referencia/Carotenoides\_2014

Processing Method:	150410_CAR_MGD	Project Name:	Referencia/Carotenoides_2014
Processing Method ID:	18520	System:	HPLC3a
Calibration ID:	18656	Channel:	2998 Ch1 450nm@1.2nm
Date Calibrated:	04-06-2016 11:08:51	Proc. Chnl. Descr.:	2998 Ch1 450nm@1.2nm

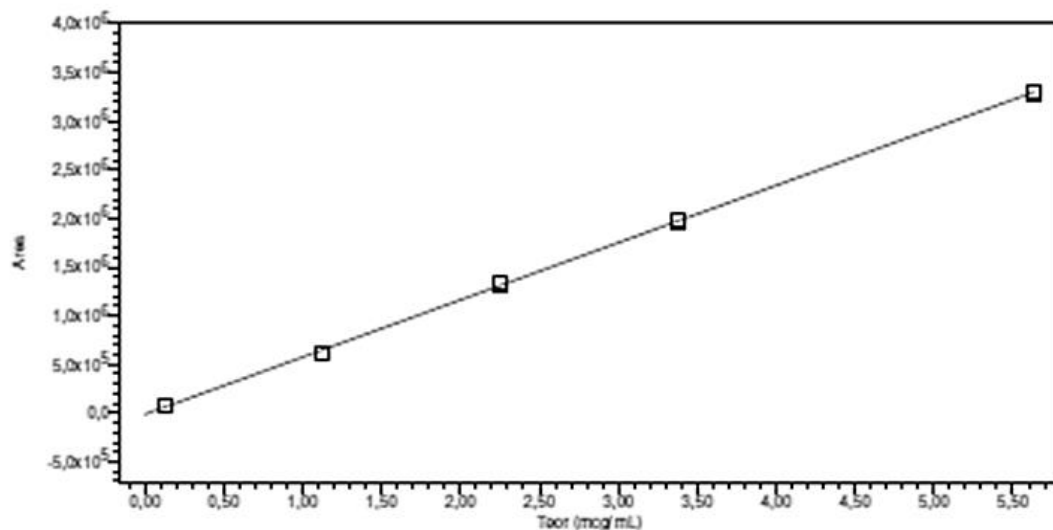
Curva Calibração group for b-apo-8'-carotenal contains no data.

Point Information \* Peak: b-apo-8'-carotenal table contains no data.

Curva Calibração group contains no data.

Curva Calibração group for equinenona contains no data.

Point Information \* Peak: equinenona table contains no data.



Name: b-criptoxantina; A: -11659,21; B: 587397,54; Standard Error: 21939,36; R: 0.999846; R<sup>2</sup>: 0.999693; Equation: Y = 5,87e+005 X - 1,17e+004; RT: 8,370; Fit Type: Linear (1st Order); Cal Curve id: 18661; Weighting: None

## Peak: b-criptoxantina

	Sample Name	Result id	Name	Level	X Value	Response	Calc. Value	% Deviation	Manual	Ignore
1	P1	18674	b-criptoxantina		0,128	80017,641	0,156	-17,73	No	No



## Curva Calibração

Reported by User: Graça Dias (Gdias)

Project Name: Referencia/Carotenoides\_2014

Processing Method:	150410_CAR_MGD	Project Name:	Referencia/Carotenoides_2014
Processing Method ID:	18520	System:	HPLC3a
Calibration ID:	18656	Channel:	2998 Ch1 450nm@1.2nm
Date Calibrated:	04-05-2016 11:09:51	Proc. Chnl. Descr.:	2998 Ch1 450nm@1.2nm

### Peak: b-criptoxantina

	Sample Name	Result Id	Name	Level	X Value	Response	Calc. Value	% Deviation	Manual	Ignore
2	P1	18680	b-criptoxantina		0,128	79454,130	0,155	-17,22	No	No
3	P2	18686	b-criptoxantina		1,127	614627,183	1,066	5,68	No	No
4	P2	18692	b-criptoxantina		1,127	617890,451	1,072	5,14	No	No
5	P3	18698	b-criptoxantina		2,254	1337269,662	2,296	-1,87	No	No
6	P3	18704	b-criptoxantina		2,254	1323441,775	2,273	-0,85	No	No
7	P4	18710	b-criptoxantina		3,380	1978999,137	3,389	-0,26	No	No
8	P4	18716	b-criptoxantina		3,380	1971874,692	3,377	0,10	No	No
9	P6	18730	b-criptoxantina		5,634	3285180,487	5,613	0,38	No	No
10	P6	18736	b-criptoxantina		5,634	3306611,457	5,649	-0,27	No	No

Curva Calibração group contains no data.



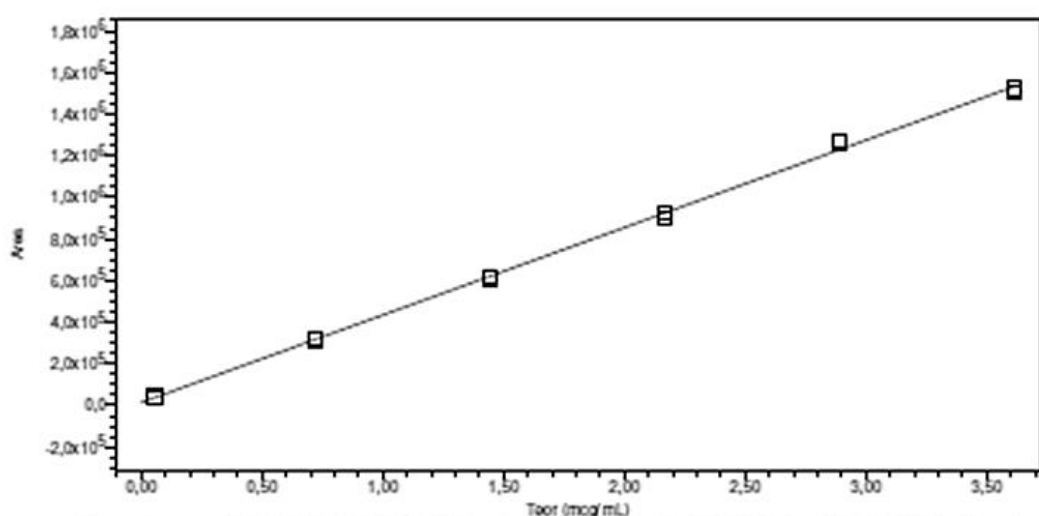
# Curva Calibração

Reported by User: Graça Dias (Gdias)

Project Name: Referencial/Carotenoides\_2014

Processing Method:	150410_CAR_MGD	Project Name:	Referencial/Carotenoides_2014
Processing Method ID:	18520	System:	HPLC3a
Calibration ID:	18656	Channel:	2998 Ch1 450nm@1.2nm
Date Calibrated:	04-05-2016 11:08:51	Proc. Chnl. Descr.:	2998 Ch1 450nm@1.2nm

Curva Calibração group contains no data.



Name: lycopeno; A 13031,65; B 420652,65; Standard Error 21128,40; R: 0,999295; R<sup>2</sup>: 0,998590; Equation: Y = 4,21e+005 X + 1,30e+004; RT: 13,100; Fit Type: Linear (1st Order); Cal Curve Id: 18662; Weighting: None

## Peak: lycopeno

	Sample Name	Result Id	Name	Level	X Value	Response	Calc. Value	% Deviation	Manual	Ignore
1	P1	18674	licopeno		0,057	40517,347	0,065	-12,92	No	No
2	P1	18690	licopeno		0,057	41132,364	0,067	-14,82	No	No
3	P2	18696	licopeno		0,723	314326,240	0,716	0,90	No	No
4	P2	18692	licopeno		0,723	318322,682	0,726	-0,42	No	No
5	P3	18698	licopeno		1,445	607952,429	1,414	2,19	No	No
6	P3	18704	licopeno		1,445	615125,610	1,431	0,98	No	No
7	P4	18710	licopeno		2,168	925901,515	2,170	-0,10	No	No
8	P4	18716	licopeno		2,168	899509,489	2,107	2,88	No	No



# Curva Calibração

Reported by User: Graça Dias (Gdias)

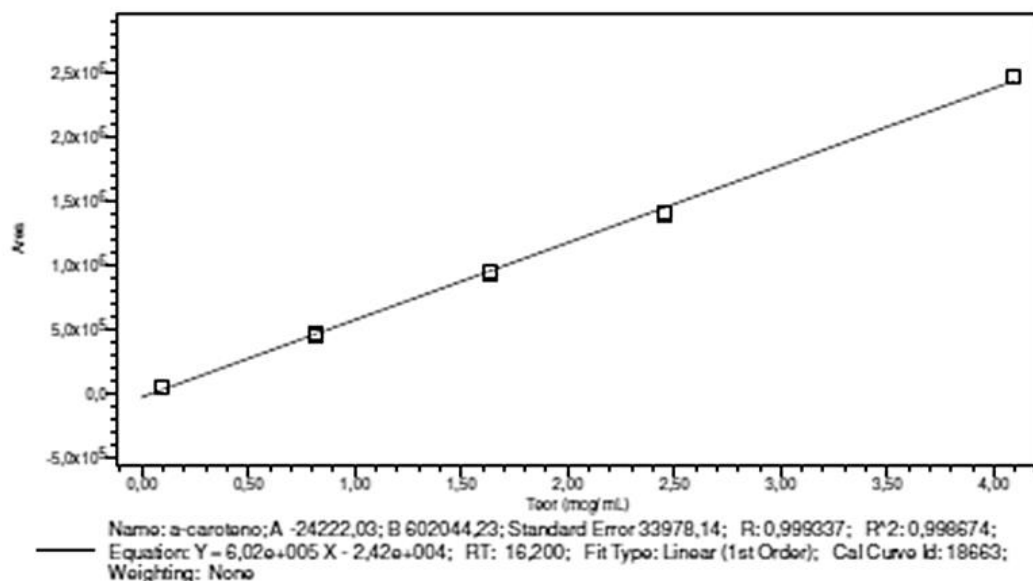
Project Name: Referencial/Carotenoides\_2014

Processing Method:	150410_CAR_MGD	Project Name:	Referencial/Carotenoides_2014
Processing Method ID:	18520	System:	HPLC3a
Calibration ID:	18656	Channel:	2998 Ch1 450nm@1.2nm
Data Calibrated:	04-05-2016 11:08:51	Proc. Chnl. Descr.:	2998 Ch1 450nm@1.2nm

## Peak: licopeno

	Sample Name	Result Id	Name	Level	X Value	Response	Calc. Value	% Deviation	Manual	Ignore
9	P5	18720	licopeno		2,891	1269279,730	2,986	-3,21	No	No
10	P5	18724	licopeno		2,891	1262451,026	2,970	-2,68	No	No
11	P6	18730	licopeno		3,613	1505705,925	3,548	1,83	No	No
12	P6	18736	licopeno		3,613	1523859,208	3,592	0,61	No	No

Curva Calibração group contains no data.



## Peak: a-caroteno

	Sample Name	Result Id	Name	Level	X Value	Response	Calc. Value	% Deviation	Manual	Ignore
1	P1	18674	a-caroteno		0,092	60644,330	0,141	-35,02	No	No



# Curva Calibração

Reported by User: Graça Dias (Gdias)

Project Name: Referencia/Carotenoides\_2014

Processing Method:	150410_CAR_MGD	Project Name:	Referencia/Carotenoides_2014
Processing Method ID:	18520	System:	HPLC3a
Calibration ID:	18656	Channel:	2998 Ch1 450nm@1.2nm
Date Calibrated:	04-05-2016 11:09:51	Proc. Chnl Descr.:	2998 Ch1 450nm@1.2nm

## Peak: a-caroteno

	Sample Name	Result ID	Name	Level	X Value	Response	Calc. Value	% Deviation	Manual	Ignore
2	P1	18680	a-caroteno		0,092	59421,788	0,139	-34,07	No	No
3	P2	18686	a-caroteno		0,819	479973,385	0,837	-2,25	No	No
4	P2	18692	a-caroteno		0,819	456184,282	0,798	2,59	No	No
5	P3	18698	a-caroteno		1,637	945241,311	1,610	1,67	No	No
6	P3	18704	a-caroteno		1,637	946719,364	1,613	1,51	No	No
7	P4	18710	a-caroteno		2,456	1413394,852	2,388	2,84	No	No
8	P4	18716	a-caroteno		2,456	1401101,342	2,367	3,73	No	No
9	P6	18730	a-caroteno		4,093	2471502,084	4,145	-1,27	No	No
10	P6	18736	a-caroteno		4,093	2475744,791	4,152	-1,44	No	No

Curva Calibração group for cis-a-caroteno contains no data.

Point Information ' Peak: cis-a-caroteno' table contains no data.

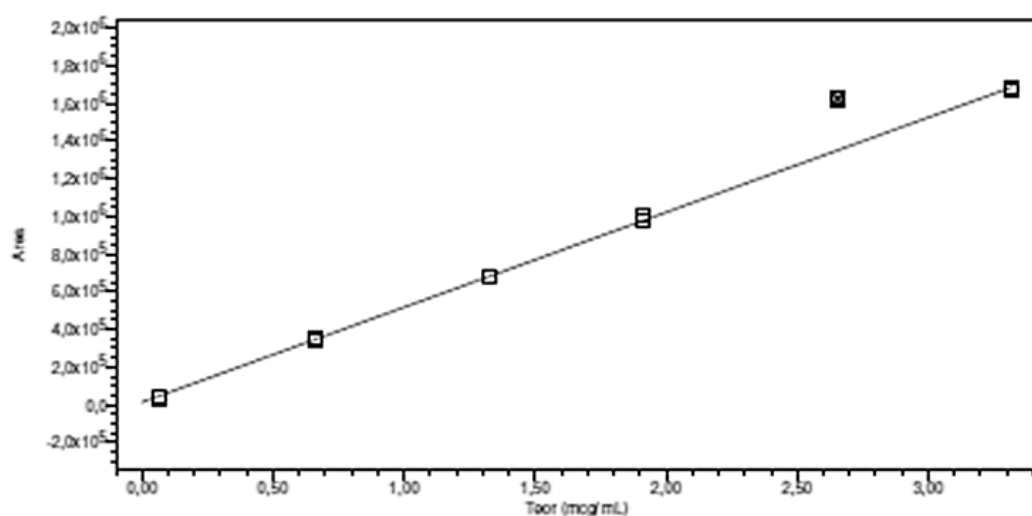


# Curva Calibração

Reported by User: Graça Dias (Gdias)

Project Name: Referencial/Carotenoides\_2014

Processing Method:	150410_CAR_MGD	Project Name:	Referencial/Carotenoides_2014
Processing Method ID:	18520	System:	HPLC3a
Calibration ID:	18656	Channel:	2998 Ch1 450nm@1.2nm
Date Calibrated:	04-06-2016 11:09:51	Proc. Chnl. Descr.:	2998 Ch1 450nm@1.2nm



Name: b-caroteno; A 14383,15; B 503093,71; Standard Error 14363,07; R: 0,999740; R<sup>2</sup>: 0,999479;  
Equation:  $Y = 5,03e+005 X + 1,44e+004$ ; RT: 18,000; Fit Type: Linear (1st Order); Cal Curve Id: 18665;  
Weighting: None

## Peak: b-caroteno

	Sample Name	Result Id	Name	Level	X Value	Response	Calc. Value	% Deviation	Manual	Ignore
1	P1	18674	b-caroteno		0,065	38268,378	0,047	36,28	No	No
2	P1	18680	b-caroteno		0,065	37366,627	0,046	41,62	No	No
3	P2	18686	b-caroteno		0,664	358371,904	0,684	-2,93	No	No
4	P2	18692	b-caroteno		0,664	344233,352	0,656	1,23	No	No
5	P3	18698	b-caroteno		1,327	680166,235	1,323	0,30	No	No
6	P3	18704	b-caroteno		1,327	682607,994	1,328	-0,06	No	No
7	P4	18710	b-caroteno		1,911	1008549,648	1,976	-3,29	No	No
8	P4	18716	b-caroteno		1,911	976080,717	1,912	-0,03	No	No
9	P5	18720	b-caroteno		2,655	1630867,994			No	Yes



## Curva Calibração

Reported by User: Graça Dias (Gdias)

Project Name: Referencial/Carotenoides\_2014

Processing Method:	150410_CAR_MGD	Project Name:	Referencial/Carotenoides_2014
Processing Method ID:	18520	System:	HPLC3a
Calibration ID:	18656	Channel:	2998 Ch1 450nm@1.2nm
Date Calibrated:	04-06-2016 11:08:51	Proc. Chnl. Descr.:	2998 Ch1 450nm@1.2nm

### Peak: b-caroteno

	Sample Name	Result Id	Name	Level	X Value	Response	Calc. Value	% Deviation	Manual	Ignore
10	P5	18724	b-caroteno		2,655	1619461,743			No	Yes
11	P6	18730	b-caroteno		3,319	1681473,414	3,314	0,15	No	No
12	P6	18736	b-caroteno		3,319	1667090,538	3,285	1,02	No	No

Curva Calibração group for cis-b-caroteno contains no data.

Point Information ' Peak: cis-b-caroteno' table contains no data.

Curva Calibração group contains no data.



## Anexo 4 – Valores das incertezas para o material de referência interno

**Tabela A4.1.** Incerteza para cada carotenoide da amostra de material de referência interno

Amostras	Incerteza (mg/100 g)				
	$\alpha$ -caroteno	$\beta$ -caroteno	$\beta$ -criptoxantina	Licopeno	Luteína
<b>1</b>	0,027	0,12	0,037	0,49	0,015
<b>2</b>	0,037	0,15	0,052	0,38	0,022



## Anexo 5 - Incerteza dos estudos de validação referente ao efeito de sazonalidade

**Tabela A5.1.** Valores de incerteza (i) dos estudos de validação referente ao efeito de sazonalidade em produtos hortícolas

Amostras		Teor de Carotenoides (mg/100g)					
		$\alpha$ -caroteno	$\beta$ -caroteno	$\beta$ -criptoxantina	Licopeno	Luteína	Zeaxantina
Brócolos	Média	ND	0,5146	ND	ND	1,1717	ND
	i		0,0926			0,2168	
Couve-flor	Média	ND	0,0030	ND	ND	0,0081	ND
	i		0,0005			0,0015	
Tomate	Média	ND	0,5606	ND	3,4404	0,8845	ND
	i		0,1009		0,4541	0,1636	
Pimento	Média	ND	0,7964	ND	ND	0,4870	0,2901
	i		0,1434			0,0901	0,0722
Alface	Média	ND	1,8641	ND	ND	2,1559	ND
	i		0,3355			0,3988	
Grelos	Média	ND	4,5155	ND	ND	8,0276	ND
	i		0,8128			1,4851	
Nabiças	Média	ND	5,2166	ND	ND	8,3080	ND
	i		0,9390			1,5370	
Feijão-verde	Média	ND	0,1955	ND	ND	0,5970	ND
	i		0,0352			0,1104	
Cenoura	Média	7,1062	12,7040	ND	ND	2,4275	ND
	i	1,1299	2,2867			0,4491	

i – Incerteza; ND – Não detetado



## Anexo 6 – Incertezas para o material de referência certificado

**Tabela A6.1.** Incerteza para cada carotenoide da amostra de material de referência certificado (Chief, 2002)

	<b>Incerteza (%)</b>
<b><math>\alpha</math>-caroteno total</b>	19,2
<b><math>\beta</math>-caroteno total</b>	20,1
<b><math>\beta</math>-criptoxantina</b>	22,4
<b>Licopeno total</b>	21,4
<b>Luteína</b>	28,4
<b>Zeaxantina</b>	16,3



## Anexo 7 – Folha de cálculo utilizada na determinação da homogeneidade das amostras de tomate

Table 1				
Insert analytical results		D	S	D <sup>2</sup>
Sample No.	result a (mg/kg)	result b (mg/kg)	(a-b)	(a+b)
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				
8				
9				
10				
11				
12				
Sum	0,000000	0,000000		0,000000
Avg	NOT AVAILABLE	variance	NOT AVAILABLE	
		MSB	NOT AVAILABLE	
Table 2				
Choose your Target Standard deviation (Target SD)		#VALOR!	mg/kg	
HORWITZ "SD" CALCULATOR				
Average concentration of analyte in set of tested samples		NOT AVAILABLE	mg/kg	
Calculated Target SD (6 <sub>s</sub> )		NOT AVAILABLE	mg/kg	
Additional calculations: see ref.1				
Cochran's test (ratio)		NOT AVAILABLE	Cochran's test	

Testing procedure visualization: Manganese (Mn) in table grapes

TDS sample homogeneity evaluation:

**NOT EVALUATED**

Cochran's test

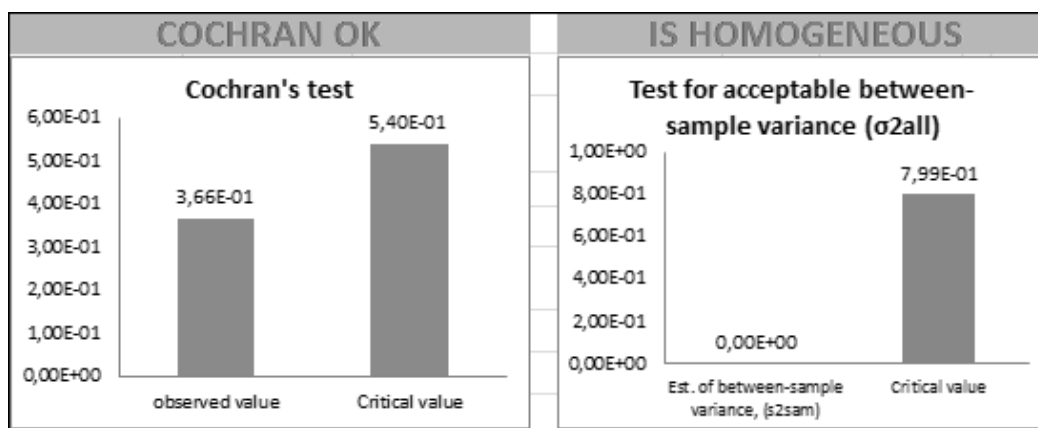
**NOT EVALUATED**

Test for acceptable between-sample variance (σ<sup>2</sup><sub>all</sub>)

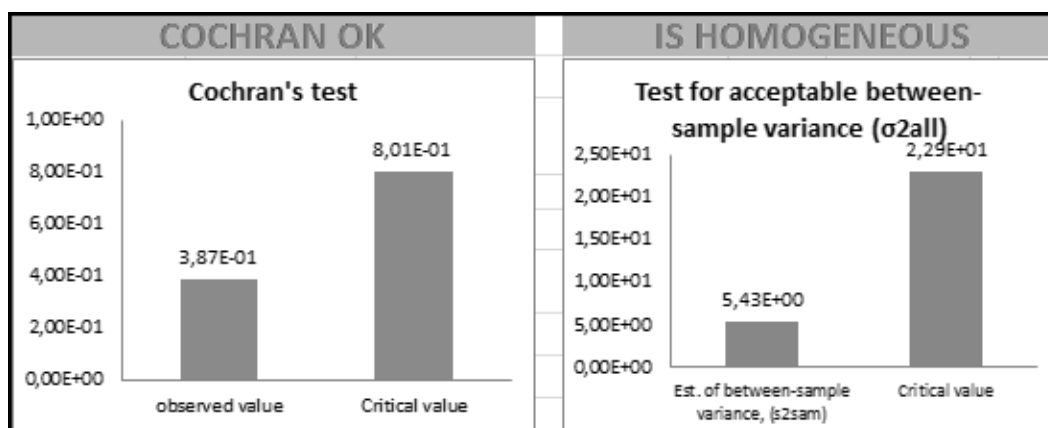




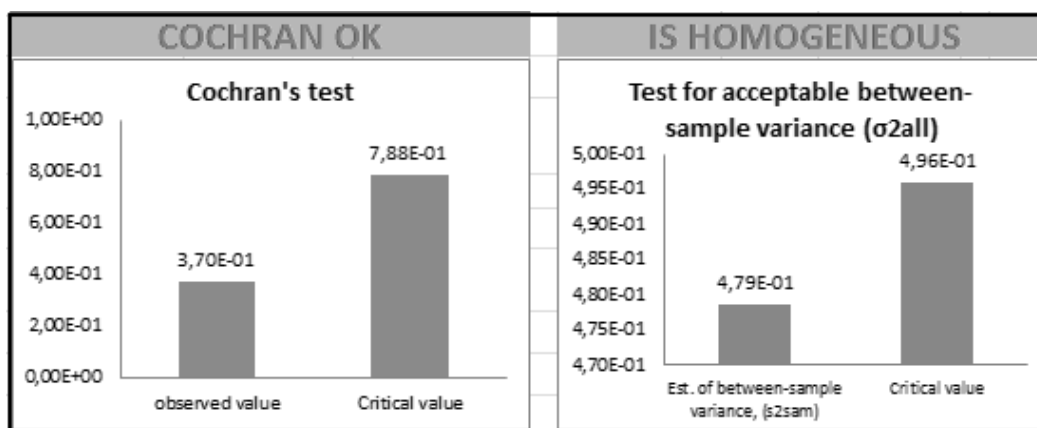
## Anexo 8 – Teste de Cochran (outliers e homogeneidade)



**Figura A8.1.** Outleirs (Cochran test) e homogeneidade dos teores de  $\beta$ -caroteno em 12 sub-amostras de tomate



**Figura A8.2.** Outleirs (Cochran test) e homogeneidade dos teores de licopeno em 12 sub-amostras de tomate



**Figura A8.3.** Outleirs (Cochran test) e homogeneidade dos teores de luteína em 12 sub-amostras de tomate

## Anexo 9 - Folha de cálculo utilizada para determinação do teor de carotenoides



Departamento de Alimentação e Nutrição  
Laboratório de Química

Teor de carotenóides  
Analitos não esterificados

Amostra		Nº amostra		Nº/data requis.																									
Executante		Pasta		Observações																									
<b>Data análise</b>																													
<table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="2">trans-<math>\beta</math>-caroteno</th> <th colspan="2">trans-<math>\beta</math>-caroteno</th> <th colspan="2">cis-<math>\beta</math>-caroteno</th> <th colspan="2">cis-<math>\beta</math>-caroteno</th> <th colspan="2">trans-<math>\beta</math>-caroteno</th> <th colspan="2">cis-<math>\beta</math>-caroteno</th> </tr> <tr> <th>1</th> <th>2</th> <th>1</th> <th>2</th> <th>1</th> <th>2</th> <th>1</th> <th>2</th> <th>1</th> <th>2</th> <th>1</th> <th>2</th> </tr> </thead> </table>						trans- $\beta$ -caroteno		trans- $\beta$ -caroteno		cis- $\beta$ -caroteno		cis- $\beta$ -caroteno		trans- $\beta$ -caroteno		cis- $\beta$ -caroteno		1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
trans- $\beta$ -caroteno		trans- $\beta$ -caroteno		cis- $\beta$ -caroteno		cis- $\beta$ -caroteno		trans- $\beta$ -caroteno		cis- $\beta$ -caroteno																			
1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2																		
Replicado		1		2		1		2		1		2		1		2													
Saponificação		não		sim		não		sim		não		sim		não		sim													
Recta Calibração Y(Area) vs X( $\mu$ g/mL)	Declive																												
	Ordenada Origem																												
	$r^2$																												
	Resíduos < 10% (níveis 2 a 6)	sim				sim				sim				sim															
Toma (g)		0,0000		0,0000		0,0000		0,0000		0,0000		0,0000		0,0000		0,0000													
Volume reconstituição (mL)		0,0		0,0		0,0		0,0		0,0		0,0		0,0		0,0													
Diluição		0		0		0		0		0		0		0		0													
Teor replicado ( $\mu$ g/mL)		###		###		###		###		###		###		###		###													
Teor replicado (mg/100 g)		###		###		###		###		###		###		###		###													
Desvio padrão relativo da repetibilidade (%)		#DIV/0!		#DIV/0!		#DIV/0!		#DIV/0!		#DIV/0!		#DIV/0!		#DIV/0!		#DIV/0!													
Teor médio amostra (mg/100 g)		#DIV/0!		#DIV/0!		#DIV/0!		#DIV/0!		#DIV/0!		#DIV/0!		#DIV/0!		#DIV/0!													
Recuperação (%)		0,00		0,00		0,00		0,00		0,00		0,00		0,00		0,00													
Teor replicado após recup. (mg/100 g)		###		###		###		###		###		###		###		###													
Desv. padrão rel. repetibilidade após recuperação		#DIV/0!		#DIV/0!		#DIV/0!		#DIV/0!		#DIV/0!		#DIV/0!		#DIV/0!		#DIV/0!													
Teor médio amostra após recuperação (mg/100 g)		#DIV/0!		#DIV/0!		#DIV/0!		#DIV/0!		#DIV/0!		#DIV/0!		#DIV/0!		#DIV/0!													
Pravitaminas A em equivalente retinal ( $\mu$ g/100 g)		#DIV/0!		#DIV/0!		#DIV/0!		#DIV/0!		0,0000		#DIV/0!		0,00		0,00													
Teor amostra (mg/100 g)		#DIV/0!		#DIV/0!		#DIV/0!		#DIV/0!		#DIV/0!		#DIV/0!		#DIV/0!		#DIV/0!													
Teor amostra - resultado final (mg/100 g)																													
Resultado final (rúbrica e data)																													
Confirmação (rúbrica e data)																													
Validação (rúbrica e data)																													

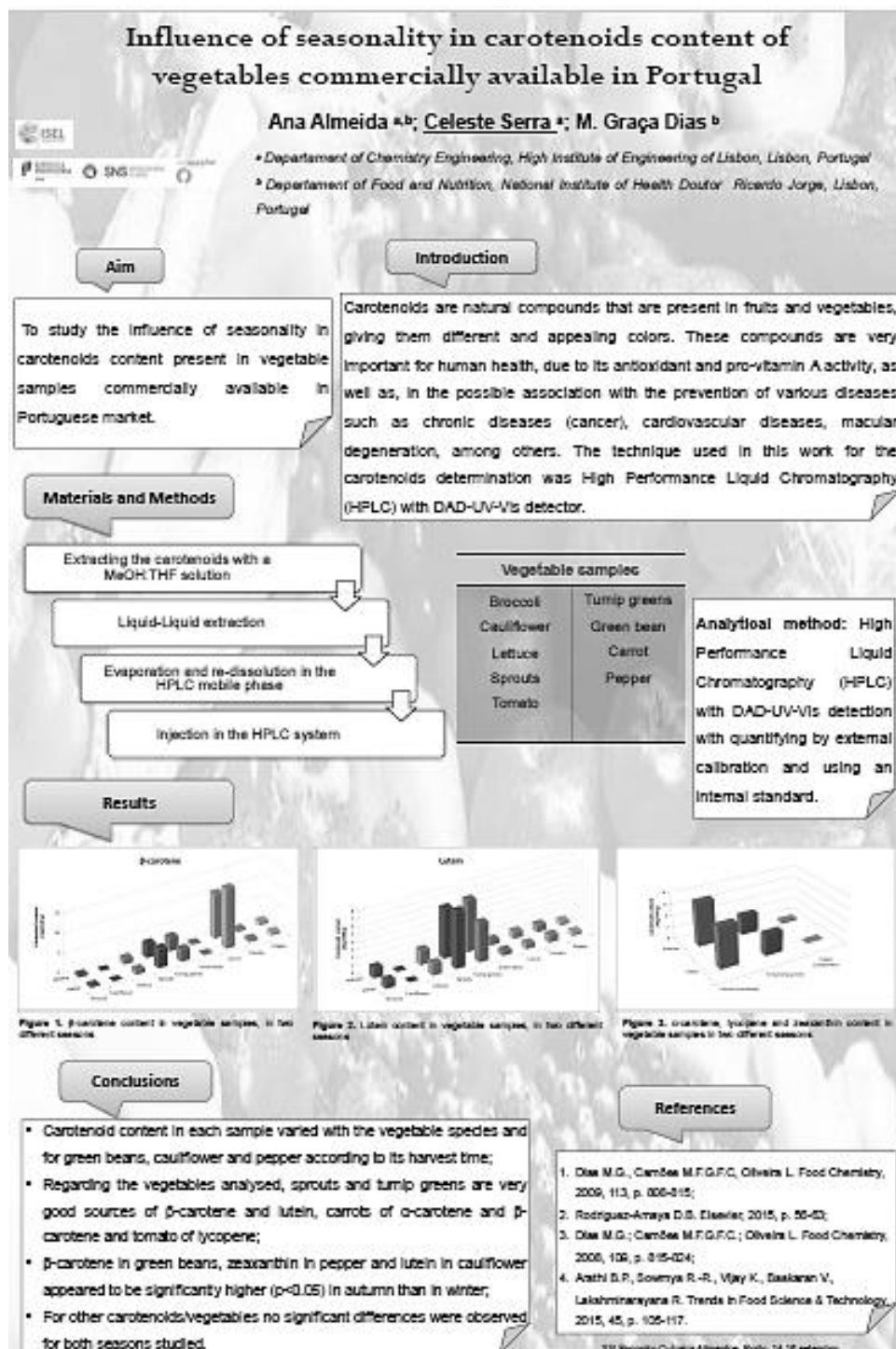


## Anexo 10 - Poster exposto no Fórum de Engenharia Química e Biológica'16, ISEL (2016)





## Anexo 11 – Poster exposto no XIII Encontro Química Alimentos (XIII EQA), Porto (2016)







## Anexo 12 – Poster exposto na 9ª Reunião Anual PortFir, INSA (2016)

